UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

ANNÉE 1954 — N° 129

PROBLÈMES IMMUNO-HÉMATOLOGIQUES POSÉS PAR LES THROMBOCYTES

Travail effectué au Centre régional de Transfusion sanguine de Bordeaux.
(Directeur : Professeur L. MASSE)

THÈSE POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE

Présentée et soutenue publiquement le vendredi 23 juillet 1954

PAR

Jean-Marcel DARRIGOL

Élève de l'École principale du Service de Santé de la Marine et des Colonies,
Diplômé de Médecine aéronautique.

Né à BORDEAUX (Gironde), le 15 avril 1927.

Examinateurs de la Thèse

MM. MASSE, professeur	*Président.*	
SARIC, professeur	*Juges.*	
VERGER, agrégé	*Juges.*	
LEGER, maître de Conf., agréé.	*Juges.*	

BORDEAUX
IMPRIMERIE LIBRAIRIE DELMAS
6, Place Saint-Christoly, 6

1954

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543913_0024

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

ANNÉE 1954 — N° 129

PROBLÈMES IMMUNO-HÉMATOLOGIQUES POSÉS PAR LES THROMBOCYTES

Travail effectué au Centre régional de Transfusion sanguine de Bordeaux.
(Directeur : Professeur L. MASSE)

THÈSE POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE

Présentée et soutenue publiquement le vendredi 23 juillet 1954

PAR

Jean-Marcel DARRIGOL

Élève de l'École principale du Service de Santé de la Marine et des Colonies,
Diplômé de Médecine aéronautique.

Né à BORDEAUX (Gironde), le 15 avril 1927.

Examinateurs de la Thèse

MM. MASSE, professeur ..... *Président.*
SARIC, professeur ..... *Juges.*
VERGER, agrégé ..... *Juges.*
LEGER, maître de Conf., agrégé. *Juges.*

BORDEAUX
IMPRIMERIE LIBRAIRIE DELMAS
6, Place Saint-Christoly, 6

1954

FACULTÉ DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE BORDEAUX

DOYENS HONORAIRES : MM. DUPÉRIÉ, CHELLE.

DOYEN : M. PORTMANN.

ASSESSEUR : M. SIGALAS.

PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. A. MANDOUL, GUYOT, ANDÉRODIAS, ROCHER, LANDE, DUVERGEY, CARLES, LEURET, PERY, LABAT, CHARRIER, DUBREUIL, CRUCHET.

PROFESSEURS :

	MM.		MM.
Clinique médicale	CREYX.	Pathologie générale et expérim...	SARIC.
id.	BROUSTET.	Clinique ophtalmologique	BEAUVIEUX.
Clinique chirurgicale	PAPIN.	Clinique chirurg. inf. et orthop.	POUYANNE.
Clinique chirurgicale	MASSÉ.	Clin. médicale des malad. infect.	AUBERTIN.
Clinique d'accouchements	RIVIÈRE.	Chimie biologique	TAYEAU.
Clinique gynécologique	MAGENDIE.	Physique méd. et pharmaceutique.	PIFFAULT.
Anatomie pathol. et microsc. clin.	DE GRAILLY.	Méd. col. et clin. mal. exotiques.	BONNIN.
Anatomie	DUFOUR.	Clin. malad. cutanées et syphilit.	JOULIA.
Anatomie générale et histologie.	MAYER.	Clin. des mal. des voies urinaires.	DARGET.
Hygiène et clin. de la tubercul.	PIÉCHAUD.	Clin. mal. nerveuses et mentales.	DELMAS-MARSALET.
Médecine légale et du Travail.	DERVILLÉE.	Clin. d'oto-rhino-laryngologie ..	PORTMANN.
Electroradiol. et clin. d'él. médic.	REBOUL.	Toxicologie et hygiène appliquée.	CASTAGNOU.
Chimie	MESNARD.	Clinique odonto-stomatologique ..	DUBECQ.
Matière médicale	GOLSE.	Clin. méd. des mal. des enfants.	FONTAN.
Pharmacie	VITTE.	Botanique et cryptogamie	GIRARD.
Physiologie	FABRE.	Thérapeutique	TRAISSAC
Zoologie et parasitologie	R. SIGALAS.	Hydrologie thérapeut. et climat.	DUBARRY.

PROFESSEUR A TITRE PERSONNEL

BLANQUET (Physique pharmaceutique).

PROFESSEURS SANS CHAIRE :

MAHON (Obstétrique). — PAUTRIZEL (Parasitologie).

MAITRES DE CONFÉRENCES AGRÉGÉS :

	MM.		MM.
Physiologie	Mlle ROUGIER.	Pharmacie (2e Section)	MASQUELIER. QUILICHINI.
Bactériologie	MOUSTARDIER.	Pharmacie (3e Section)	CAZAUX.
Anatomie pathologique	LEGER.	Biochimie médicale	NEUZIL.
Anatomie	RIGAUD.	Pathologie expérimentale	FAURE.
Pharmacie (1re Section)	R. GOLSE.		

AGRÉGÉS EN EXERCICE :

	MM.		MM.
Médecine générale	N... F.-J. TRAISSAC. BERGOUIGNAN. LENG-LÉVY. LAVIGNOLLE. MORETTI.	Obstétrique	CHASTRUSSE. FAUGÈRE.
		Ophtalmologie	BESSIÈRE.
		Oto-rhino-laryngologie	DESPONS.
		Dermatologie et syphiligraphie ..	LE COULANT.
		Pédiatrie et Puériculture	VERGER.
Chirurgie générale	LAUMONIER. CHAVANNAZ. VILLAR. TINGAUD. DEPAULIS.	Méd. légale et méd. du Travail.	L'ÉPÉE.
		Electroradiologie	LACHAPÈLE.
		Odonto-stomatologie	BENOIT.
		Urologie	LANGE.

CHARGÉ DES FONCTIONS DE MAITRE DE CONFÉRENCES AGRÉGÉ :

M. R. STOLL (Histologie).

COURS COMPLÉMENTAIRES :

	MM.		MM.
Médecine opératoire	LAUMONIER.	Organographie et Physiol. végét.	TEMPERE.
Accouchements	CHASTRUSSE.	Chimie biologique-analytique	MARQUEVIELLE.
Puériculture	VERGER.	Chimie analytique	BABIN.
id.	PERY.	Pathologie chirurgicale	VILLAR. LAUMONIER.
Législation pharmaceutique	COUSTOU.	Zoologie pharmaceutique	BAILENGER.
Anatomie	CABANIÉ.	Obstétricie sociale	MAHON.
Cryptogamie	LAUBIE.	Physiologie	BENELLI
Médecine légale	L'EPEE.		

Le Secrétaire principal de la Faculté . ROUGERIE.

Par délibération du 5 août 1879, la Faculté a arrêté que les opinions émises dans les Thèses qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle entend ne leur donner ni approbation ni improbation.

BIBLIOTHEEK LEIDEN

A MA FEMME

A MES PARENTS

A MES BEAUX-PARENTS

A TOUS LES MIENS

A MES CAMARÀDES DE L'ECOLE DE SANTE NAVALE
ET COLONIALE

A Monsieur le Docteur J. MOULINIER

Ancien Externe des Hôpitaux,
Lauréat de la Faculté,
Médecin-Assistant du Centre régional de Transfusion sanguine.

Qui nous inspira le sujet de ce travail et fut toujours pour nous un guide précieux; qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre profonde gratitude.

A Monsieur le Médecin commandant GRENIER DE CARDENAL

Chef de laboratoire des Hôpitaux militaires,
Chef du Service de laboratoire et des maladies infectieuses
de l'Hôpital militaire Robert-Picqué.

Qui nous fit l'honneur de nous confier ses malades et fut toujours pour nous d'un précieux conseil.

A tous ceux qui, au Centre régional de Transfusion sanguine, nous ont prêté un amical concours dans la réalisation de ce travail.

A Monsieur le Médecin-Commandant B. MAUPIN

Du Service central de Transfusion-Réanimation de l'Armée,
Spécialiste des Hôpitaux militaires.

Qui nous fit bénéficier de toute son expérience sur les thrombocytes; qu'il veuille bien trouver ici l'expression de nos respectueux remerciements.

A NOS PROFESSEURS DE L'ECOLE DE SANTE NAVALE

A NOS MAITRES DE LA FACULTE ET DES HOPITAUX DE BORDEAUX

A Monsieur le Médecin général de 1re classe TABET

Directeur de l'Ecole principale du Service de santé de la Marine
et des Troupes coloniales,
Spécialiste des Hôpitaux maritimes,
Commandeur de la Légion d'honneur,
Commandeur de l'Ordre de la Santé publique,
Officier du Mérite maritime.

A Monsieur le Médecin en chef de 1re classe CONSTANS

Sous-Directeur de l'Ecole principale du Service de santé de la Marine
et des Troupes coloniales,
Spécialiste des Hôpitaux maritimes,
Chevalier de la Légion d'honneur,
Croix de guerre 1939-1945.

A NOS JUGES :

Monsieur le Docteur H. LEGER

Maître de Conférences, Agrégé d'Anatomie pathologique,
Médecin des Hôpitaux.

Monsieur le Docteur P. VERGER

Agrégé de Puériculture,
Médecin des Hôpitaux,
Officier d'Académie.

Monsieur le Professeur René SARIC

Professeur de Pathologie générale et expérimentale,
Médecin des Hôpitaux.

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur L. MASSE

Professeur de Clinique chirurgicale,
Chirurgien des Hôpitaux,
Directeur du Centre régional de Transfusion sanguine,
Associé national de l'Académie de Chirurgie,
Membre du Comité français de l'Association internationale de Chirurgie,
Chevalier de la Légion d'honneur,
Chevalier de l'Ordre de la Santé publique,
Officier de l'Instruction publique.

Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre respectueuse gratitude pour tout l'enseignement que nous lui devons par notre séjour dans son service du Centre régional de Transfusion sanguine et pour l'honneur qu'il nous fait en acceptant la présidence de notre thèse.

PROBLÈMES IMMUNO-HÉMATOLOGIQUES POSÉS PAR LES THROMBOCYTES

INTRODUCTION

En septembre 1953, le Docteur J. Moulinier, à son retour du Congrès d'Amsterdam, où il avait exposé ses *Recherches immunologiques dans les leucoses* [51], nous fit une synthèse de l'hématologie européenne.

L'impression très nette qui s'en dégageait était la place prépondérante réservée à l'immuno-hématologie, surtout à l'immunologie des thrombocytes.

La première notion en avait été fournie par Evans en 1951 [17], qui avait attiré l'attention sur les analogies possibles entre les anémies hémolytiques immunologiques et certains purpuras thrombopéniques, en mettant en évidence, dans certains cas, de faibles agglutinines anti-thrombocytes.

En France, Dausset et Delafontaine (1951) [17] rapportaient d'une manière plus précise l'observation d'un purpura thrombopénique, dont le sérum agglutinait massivement tous les thrombocytes humains. Mieux encore : ce sérum inhibait la rétraction d'un caillot.

A la même époque, deux équipes de chercheurs américains (Stefanini Dameshek [64], Harrington [30]), démontraient la présence d'un facteur plasmatique thrombocytotoxique par des injections intraveineuses de plasma, soit à l'homme,

soit à l'animal. Les mêmes auteurs, au moyen de tels sérums immuns, décrivirent des groupes sanguins des thrombocytes différents des groupes sanguins des hématies.

Une telle assertion sembla prendre corps lorsque des agglutinines anti-thrombocytes furent détectées biologiquement dans le sang des polytransfusés [65]).

Ces constatations ouvraient donc la voie à des recherches qui pouvaient, dans leur application à la pathologie, être fructueuses; aussi M. le Professeur Massé et le Docteur J. Moulinier nous chargèrent-ils d'essayer de mettre au point la meilleure technique permettant la détection des agglutinines anti-thrombocytes et, à l'aide de sérums immuns recueillis, de chercher à déterminer les groupes thrombocytaires et en évaluer la fréquence.

Car les différents auteurs donnaient des résultats assez peu concordants; ceci pouvait être expliqué par l'origine immune de tels sérums.

Or, tout récemment, le Professeur Moureau, de Liége [53], par une technique d'absorption sérique, a démontré la présence d'antigènes A et B dans les thrombocytes, leur répartition correspondant à celle des antigènes A et B dans les hématies.

Une telle découverte éclairait d'un jour nouveau les problèmes immuno-hématologiques posés par les thrombocytes. En particulier, se trouvait supprimée la crainte d'une immunisation anti-thrombocytaire lors des transfusions répétées, et on pouvait en dégager la notion de diversité des facteurs anti-thrombocytaires provenant des sérums pathologiques étudiés.

Modifiant alors légèrement le plan de notre travail, nous avons cherché à vérifier la découverte du Professeur Moureau, et nous avons étudié les différentes actions de certains sérums pathologiques, en concluant à la dualité des facteurs dits thrombocytaires qui, dans certains cas, sont thrombotoxiques et angiotoxiques.

Nous ne saurions trop témoigner notre gratitude à tous

ceux qui nous aidèrent dans notre tâche et, en premier lieu, à M. le Professeur Massé, qui nous a permis d'effectuer au Centre de Transfusion toutes les recherches qui constituent ce travail; à M. le Docteur J. Moulinier, qui nous inspira cette thèse, et dont la sollicitude, la bienveillance à notre égard, l'esprit critique, les conseils, nous ont toujours été très précieux; à M. le Professeur agrégé Léger, qui voulut bien examiner nos préparations microscopiques; à M. le Médecin-Commandant B. Maupin, du Service central de Transfusion-Réanimation de l'armée, qui nous conseilla, nous guida, et nous remit avec amabilité des préparations lyophyllisées de thrombocytes; à M. le Médecin-Commandant Grenier de Cardenal, qui nous confia ses malades; à M. le Docteur Bentégeat, à M. le Docteur Massières, qui nous guidèrent au point de vue clinique.

Nous remercions enfin nos camarades du Laboratoire du Centre de Transfusion sanguine, MM. Courrouge et Sarrat, ainsi que le personnel du Centre de Transfusion, et, en particulier, Mlles F. Bonnard et J. Carmouze, pour leur contribution technique.

CHAPITRE PREMIER

CONDITIONS GENERALES D'ETUDE DES THROMBOCYTES

« Les thrombocytes jouent un rôle primordial dans la coagulation du sang. L'endothélium vasculaire lésé devient mouillable. Sur cette surface mouillable, les thrombocytes s'agglutinent, bouchent la brèche vasculaire, formant le classique clou hémostatique de Hayem ou thrombus blanc. » (Leroux).

Ce phénomène rapide (trois à quatre minutes) est suivi d'une lyse des éléments agglutinés : les contours du hyalomère s'estompent, se déchirent, formant une fine dentelle, et l'élément cellulaire se désintègre dans le milieu plasmatique ambiant.

Agglutination et lyse gênent considérablement l'étude des thrombocytes. Il est possible de supprimer ces deux inconvénients en prêtant une attention particulière à leur « récolte » et à leur séparation des autres éléments figurés du sang. Une telle préparation a permis d'étudier la morphologie de ces éléments à l'état vivant et, par voie de conséquence, fait progresser les connaissances biochimiques de leur constitution.

L'obtention de thrombocytes physiologiquement et morphologiquement intacts nécessite leur récolte sur une surface non mouillable.

Les connaissances toutes récentes sur ce problème ne doivent pas faire oublier les constatations — empiriques peut-être, mais frappées du sceau de la clinique — des anciens auteurs. Ne citons que la transfusion du sang à l'état « natif », par la seringue vaselinée de Bécart et son efficacité dans les cas de purpura thrombopénique. Ceci fut oublié avec l'avène-

ment des anticoagulants, car, comme l'a dit Tullis [72], les découvertes modernes « ont montré que les transfusions *de sang* se sont terminées avec l'introduction des transfusions indirectes ».

Ces connaissances récentes sont dues à l'introduction des silicones et autres agents non mouillables. Ces produits, dont il existe plusieurs spécialités, ont pour caractères d'être hydrophobes : les gouttes glissent à leur contact comme des gouttes de mercure. De plus, les silicones sont chimiquement et biologiquement inertes, et, fait intéressant en transfusion, ils sont strictement apyrogènes.

Tullis et Rochow [75] ont fait de ces produits américains une fort intéressante revue, notant leurs avantages respectifs. Pour notre part, nous avons utilisé le produit Rhodorsil 240 de la Maison Rhône-Poulenc, dans le revêtement et l'hydrofugation de notre matériel de manipulation.

I. — ***Technique d'hydrofugation du matériel de manipulation.***

Le Rhodorsil 240 est un méthylchlorosilane de synthèse, limpide, sensiblement incolore, d'odeur piquante. Il doit être manipulé avec précautions. Ce fluide, incomplètement hydrolysé, réagit chimiquement avec le fin film de vapeur d'eau qui se trouve sur toutes les surfaces; il s'hydrolyse et produit un film mince de silicone. L'attachement aux parois est rendu plus solide encore par chauffage. On obtient donc, ainsi, une pellicule non mouillable qui adhère parfaitement à toutes les parois.

Les conditions d'application du Rhodorsil 240 diffèrent selon la surface à hydrofuger. Nous allons les rappeler brièvement, en notant, en premier lieu, la nécessité absolue d'un nettoyage parfait des surfaces à enduire.

Le protocole de nettoyage suivant semble être le meilleur : lavage au savon et à l'eau, vingt-quatre heures avant l'application; rinçage soigneux à l'eau chaude du robinet; rinçage à l'eau distillée chaude apyrogène; séchage à l'étuve, deux

heures à 120°. Puis on laisse une nuit à la température de la pièce; ceci pour permettre à l'humidité atmosphérique de bien imprégner les parois, ce qui amène la constitution d'un fin film de vapeur d'eau.

Les surfaces à traiter sont les suivantes : verrerie et aiguilles. Nous ne parlerons pas du siliconage des tubulures caoutchoutées, les progrès de la technique mettant à notre disposition du matériel en matière plastique, non mouillable de par sa nature.

Flacons et verrerie de laboratoire (pipettes, tubes à hémolyse, seringues, etc.) peuvent être hydrofugés de deux manières différentes : par contact du produit, ou par le procédé dit à la vapeur.

Siliconage par contact du produit.

Le produit peut être employé pur, mais, dans ce cas, il se forme un enduit visible et gras. Pour supprimer cet aspect, il vaut mieux employer le Rhodorsil 240 en solution à 5 % dans le chloroforme.

On verse — ou on aspire — le produit dans les flacons et on laisse égoutter le liquide en excès pendant vingt minutes. On rince à l'eau distillée apyrogène. On laisse les pièces en étuve pendant une heure à 150° C.

Pour la verrerie, de grande surface, il est bon de recommencer deux à trois fois l'application.

Siliconage à la vapeur.

Ce procédé est beaucoup plus adapté à l'hydrofugation du petit matériel de laboratoire. On utilise une bouteille d'air comprimé. Ce gaz est dirigé par une tubulure d'amenée au fond d'un premier flacon, rempli de déshydratant. On reprend l'air déshydraté à la partie supérieure, et on l'envoie au fond d'un second flacon rempli de Rhodorsil 240 pur. L'air chargé de vapeur de Rhodorsil qui en sort est amené dans les récipients contenant la verrerie ou les seringues. L'opérateur

compte lentement jusqu'à six à partir du début de l'opération. La bouteille de Rhodorsil est alors déconnectée, et un courant d'air comprimé est dirigé pendant une même période de temps pour déplacer la vapeur qui n'a pas réagi.

La verrerie est alors rincée trois fois à l'eau distillée apyrogène chaude. On laisse à l'étuve à 150° C. La verrerie est alors prête.

Cette hydrofugation donne un enduit invisible et qui protège relativement bien les parois de verre. Cependant, avec B. Maupin, nous devons signaler que la stérilisation des flacons contenant du citrate de soude comme anti-coagulant amène une perte de l'hydrofugation au contact du citrate. Il semble y avoir une attaque du silicone par cet anti-coagulant.

B. Maupin nous a conseillé le procédé qu'il emploie, c'est-à-dire la stérilisation des flacons vides et, ensuite, le remplissage en anti-coagulant sous hotte stérile.

De plus, nous avons noté que sur un flacon qui n'a subi qu'un siliconage, la centrifugation à 2.500 tours-minute pendant quarante minutes amenait une striation visible à la partie supérieure du flacon. Cette striation n'apparaît pas lorsque le flacon a été siliconé plusieurs fois.

Siliconage des aiguilles.

Nous avons également employé, pour les aiguilles, le Rhodorsil 240, bien que, dans la littérature, un produit d'application plus rapide soit signalé : l'Arcquad 2 C. B. Maupin nous en a déconseillé l'emploi.

Les aiguilles sont préparées par les méthodes habituelles de nettoyage. On les met au contact du Rhodorsil 240 pur pendant une minute ; puis on laisse égoutter une heure à l'air. On trempe à nouveau pendant quinze minutes dans le Rhodorsil 240. On laisse égoutter une heure à l'air. On plonge une heure dans l'eau distillée apyrogène. Enfin, on sèche en étuve une heure à 150° C.

Par ce moyen donc, nous avons la possibilité d'obtenir des surfaces entièrement non mouillables, les tubulures en

matière plastique du commerce étant hydrofugées de par leur nature.

En possession de tels éléments destinés à protéger les thrombocytes, nous allons étudier maintenant leur « récolte » et leur séparation des autres éléments figurés du sang.

II. — *Récolte et séparation des thrombocytes.*

Nous avons vu toute l'importance d'un matériel siliconé dans la protection des thrombocytes.

Il convient d'y joindre l'action de la température : en effet, les thrombocytes ont moins tendance à l'agglutination spontanée lorsqu'ils sont manipulés à une température qui avoisine 4° C. [75].

Les méthodes d'obtention des thrombocytes varient selon le but de leur récolte : pour notre part, nous avons cherché à obtenir ces éléments à partir du sang d'un seul donneur : ainsi, nous n'avons pu nous servir de l'excellente méthode de récolte de B. Maupin, applicable seulement à une grosse quantité de sang [44].

Nous citerons aussi, pour mémoire, la captation des thrombocytes, pendant le passage du sang sur des colonnes de résine décalcifiantes, puis leur récupération par élution au moyen de solutions de citrate (1 %), acétate (0,2 %), sérum physiologique [34].

Procédé employé.

Le procédé que nous avons utilisé est fondé sur la centrifugation différentielle. Nous nous sommes inspiré de la technique décrite par Stefanini et Dameshek [69].

Le sang est recueilli par gravité dans un flacon siliconé, en évitant soigneusement la formation de bulles [75]. Puis, il est centrifugé à une température aussi voisine que possible de 4° C, à 1.000 tours-minute, pendant quinze minutes. Les deux tiers du plasma surnageant sont alors séparés. On y

ajoute 1/10 du volume d'une solution à 2 % de Tween 80 (1). On centrifuge alors à 4° C à 1.000 tours-minute pendant dix minutes.

On extrait encore les deux tiers du plasma surnageant, que l'on centrifuge à nouveau à 4° C à 2.500 tours-minute, pendant vingt minutes. On sépare alors le plasma surnageant, et l'on ajoute au tapis thrombocytaire une solution de sérum physiologique contenant 1/10 de son volume d'une solution à 2 % de Tween 80.

On remet les thrombocytes en suspension et l'on centrifuge à nouveau à 4° C à 2.500 tours-minute pendant vingt minutes. Les thrombocytes sont alors mis à nouveau en suspension dans une solution de sérum physiologique correspondant, en volume, au quart du plasma récolté à l'origine.

L'absence d'une centrifugeuse réfrigérée nous a conduit à divers artifices de réfrigération. Malgré cela, environ 3 sur 5 des suspensions de thrombocytes que nous avons obtenues étaient inutilisables en raison de leur auto-agglutination. Une cause d'erreur est la présence, dans la suspension thrombocytaire, d'éléments figurés, notamment de leucocytes. Nos suspensions contenaient moins d'un leucocyte pour 50.000 thrombocytes.

Pour considérer comme utilisable la suspension thrombocytaire, celle-ci ne doit présenter, macroscopiquement et microscopiquement, aucun agglutinat.

Macroscopiquement. — La lésion des thrombocytes se traduit par une rétraction du tapis thrombocytaire lors de la centrifugation. Dans ce cas, une forte agitation, même en présence de Tween 80, ne permet pas leur remise en suspension.

Microscopiquement. — Même si, macroscopiquement, la suspension thrombocytaire paraît excellente, un examen mi-

(1) Le Tween 80 utilisé dans cette méthode est un agent surface actif, qui protège les thrombocytes contre l'agglutination spontanée, et permet une resuspension facile. Cet agent ne nous a pas paru gêner les réactions biologiques ultérieures [69].

croscopique permet d'observer, dans certains cas, de fins agglutinats. Toute suspension thrombocytaire présentant ces caractéristiques doit être rejetée.

Le contrôle microscopique de la suspension obtenue s'impose donc. Si cette vérification était négligée, en effet, dans la technique d'agglutination directe (méthode de Stefanini), on obtiendrait des réactions faussement positives. De même dans la préparation de l'antigène thrombocytaire par la réactions d'hémagglutination passive, il convient de prêter une attention particulière à l'obtention des suspensions. L'expérience nous a montré, en effet, que lors de l'emploi d'une suspension imparfaite, il restait seulement le squelette des thrombocytes, les protéines solubles ayant été perdues au cours des différents lavages.

Critiques.

Nous pouvons reprocher à cette méthode :

1° la nécessité du maintien à basse température;

2° la longueur des manipulations;

3° la durée de conservation très limitée des thrombocytes obtenus.

Tullis a fixé cette durée à environ douze heures. Il est possible de la prolonger par adjonction d'agents protecteurs, mais cet artifice gêne souvent les réactions biologiques ultérieures [73].

Une suspension thrombocytaire doit donc être préparée chaque fois que l'on veut produire une réaction d'agglutination directe.

Nous venons d'étudier la récolte et la séparation des thrombocytes. Ces éléments étant ainsi obtenus, nous allons maintenant rappeler ceux de leurs caractères principaux qui nous sont utiles dans l'étude des facteurs anti-thrombocytaires.

III. — *Rappel des connaissances sur les thrombocytes.*

Comme l'a dit B. Maupin [45] : « Les thrombocytes demeurent les plus mal connus des éléments figurés du sang, du moins sous certains aspects. Les notions de chimie recueillies à leur sujet sont fragmentaires et disparates; leur métabolisme est à peine exploré; la présence d'une substance nucléaire, leur nature cellulaire même, sont discutées. »

A. — Du point de vue morphologique.

Les thrombocytes présentent deux formes différentes selon les conditions de leur examen [9] : sur frottis ou à l'état frais.

Sur frottis (Bessis [9]).

Sur des frottis même excellents, un grand nombre de ces éléments ont un aspect qui défie presque toute tentative de description. Ces formes variables, pour la plupart dendritiques, sont le résultat de la non-fixation immédiate des éléments, qui, ainsi, ont eu le temps de subir une transformation.

A côté de ces formes, on trouve des thrombocytes de 2 à 5 μ de diamètre environ, qui apparaissent comme de petits éléments arrondis ou ovalaires.

On peut y distinguer deux parties : une, périphérique, homogène, presque incolore, appelée hyalomère; l'autre, centrale, granuleuse, constituée de granulations rouge violet, appelée chromomère.

A l'état frais.

Pendant quelques minutes, on observe les *formes circulantes* arrondies ou ovoïdes, à l'intérieur desquelles on peut distinguer des granulations. Très rapidement, apparaissent *les formes dendritiques* (Bessis) qui, lorsqu'elles arrivent au

contact de la lame de verre, se fixent, adhèrent et donnent les *formes étalées*, formes de repos de Fonio, qui sont réversibles.

Tullis et son école ont montré que le pourcentage des formes dendritiques était plus grand dans le sang veineux que dans le sang artériel et qu'il était fonction de la teneur du sang en gaz carbonique.

B. — Du point de vue histochimique et biochimique.

Cette étude ne semble, par contre, qu'ébauchée.

B. Maupin, dans sa thèse de doctorat ès sciences (Paris, juin 1953), déclare qu'il n'a pu mettre en évidence, par la réaction de Feulgen, la présence d'acide désoxyribonucléique, et par conséquent, de substance nucléaire.

L'étude des lipides a montré que les lipides totaux représentaient en moyenne 19 % du poids sec, se répartissant comme suit :

— Phosphatides (les 7/5 des acides gras phosphatidiques) : 13,8 % du poids sec;

— Graisses neutres : environ 1 %;

— Cholestérol libre : environ 3,2 %;

— Cholestérol estérifié : environ 0,7 %.

Il faut ici noter que le cholestérol libre est plus important que le cholestérol estérifié.

L'étude des protéines thrombocytaires est à peine ébauchée.

B. Maupin note que les thrombocytes renferment en moyenne 11 % d'azote total et 9,12 % d'azote protéinique, soit 57 % de leur poids sec en protides totaux.

Une même détermination sur les produits solubles obtenus par une lyse prudente d'une crème ou d'un poudre plaquettaire a montré la difficulté de faire passer en solution les protides plaquettaires.

En effet, quels que soient le procédé de broyage employé et le pH de la solution tampon adoptée, le liquide surnageant, après une centrifugation de vingt minutes à 2.300 G, fortement lactescent, ne contient que la moitié environ des protéines du produit brut.

Par contre, une ultracentrifugation à 30.000 G, si elle amène un éclaircissement du lysat par sédimentation des granules du chromomère [25], ne permet pas de noter un appauvrissement sensible de ce même lysat en protéines [45].

L'étude électrophorétique à l'appareil de Tiselius a montré des courbes lisibles, aplaties, avec quatre ondulations, mais sans maximum net. La microélectrophorèse sur papier fait voir une tache significative dans la zone de l'albumine.

En résumé, peu de choses précises sont obtenues au point de vue chimique. De par la richesse en lipides, on peut penser qu'il existe dans les thrombocytes une quantité importante de lipoprotéines. Mais leur fragilité naturelle ne permet pas de les obtenir.

De cette étude, nous devons dégager un certain nombre de faits qui nous serviront dans l'étude des facteurs anti-thrombocytes :

— L'obtention de thrombocytes nécessite un soin minutieux qui doit porter essentiellement sur les surfaces d'environnement. Toute observation d'agglutination des thrombocytes par un sérum suspect doit donc s'entourer d'un luxe de précautions et être, plus que tout autre réaction immunologique, encadrée de témoins.

— Le manque de connaissances précises sur la nature protéique des thrombocytes, la faible solubilité de ces protéines, rendront tout à fait empirique une réaction indirecte fondée sur ces protéines.

CHAPITRE II

METHODES DE DEPISTAGE DES FACTEURS ANTI-THROMBOCYTAIRES

Nous avons, dans le chapitre précédent, étudié la préparation de l'un des réactifs : les thrombocytes. Cette préparation subira des modifications de détail selon les techniques employées.

Le second agent rentrant dans la réaction antigène-anticorps est le plasma ou le sérum dans lequel nous cherchons à savoir s'il existe des facteurs anti-thrombocytaires. Les plasmas ou les sérums pathologiques qui ont fait l'objet de nos recherches avaient des origines différentes : nous les avons étudiés en nous confondant aux diverses découvertes qui les concernaient.

Une revue de la littérature nous montre, en effet, que ces facteurs sériques ou plasmatiques possèdent trois propriétés : « *In vivo* », *ils sont thrombopéniants;* « *in vitro* », *ils possèdent un pouvoir thrombo-agglutinant et thrombolysant* [17-19-23-30-49-66].

Nous avons surtout étudié les deux premières de ces propriétés, la propriété thrombolysante étant un corollaire de la propriété thrombo-agglutinante et nécessitant la présence de complément.

I. — Première propriété : le facteur thrombopéniant.

Hirsch et Gardner [31], Stefanini et Dameshek [65] ont injecté du plasma riche en thrombocytes à des malades atteints de purpura thrombopénique, et noté que la survie

des thrombocytes devient progressivement plus courte, et l'influence bénéfique sur les manifestations hémorragiques moins prononcée. Les auteurs en concluent au développement d'un mécanisme destructeur des thrombocytes.

Harrington et ses collaborateurs [29] ont, de leur côté, transfusé à des individus normaux le sang de malades atteints de purpura thrombopénique idiopathique.

L'injection de 500 cm³ de sang citraté total ou de son plasma a causé une thrombopénie rapide durant cinq à sept jours, souvent dramatique, qui, lorsqu'elle était sévère, déterminait un allongement du temps de saignement, une diminution de la consommation de prothrombine et même des manifestations hémorragiques importantes de la zone digestive, nécessitant un traitement d'urgence.

Ils montrèrent aussi la persistance de ce facteur après splénectomie, et, par fractionnement, sa présence dans la partie γ globulinique des protéines.

De tels faits sont évidemment frappants et constituent une preuve non équivoque de l'existence de ce facteur thrombopéniant.

Etant donné le caractère dramatique de ces expériences, quelques auteurs ont diminué le taux de plasma ou de sérum injecté. Jamra et ses collaborateurs [37] injectent 4 cm³ de plasma d'individu thrombopénique à un sujet de 11 ans, de 34 kilos. Au bout d'une heure, la thrombopénie atteint 50 % environ.

Malgré cette diminution de gravité, il est bien évident qu'un tel test est difficilement réalisable, et, en tout cas, ne peut être répété un grand nombre de fois. Aussi s'est-on adressé aux animaux de laboratoire. Jamra [37] utilise le chien et observe des thrombopénies de 80 % en trente minutes.

Miescher [49], de son côté, a utilisé des lapins. Il note que l'injection de plasma ou de sérum thrombopéniant, à la dose de 4 à 5 cm³ par kilo de poids, amène une thrombopénie massive et la mort de l'animal en expérience, alors que la même quantité de sérum normal n'amenait aucun trouble.

De plus, en injectant par voie intradermique 0,10 cm³ de sérum pathologique, cet auteur observe une thrombopénie de 50 % avec apparition, en une heure, d'une réaction érythémateuse importante.

Nous devons dire que nous avons été séduit par cette méthode malgré les critiques que l'on peut faire, car nous voulions procéder à un test de dépistage assez rapide. Nous avons donc repris tous les points de l'étude de Miescher.

Nous avons pu juger qu'à des doses égales de sérum pathologique et de sérum normal, les thrombopénies obtenues par voie intraveineuse ne pouvaient être comparées. (Voir résultats dans les tableaux I et II ci-dessous.)

TABLEAU I

Thrombopénie produite par injections intra-veineuses de sérums humains normaux.

POIDS DE L'ANIMAL EN KG	DOSES DE SÉRUM normal injecté	NUMÉRATION DES THROMBOCYTES EN MILLIERS D'ÉLÉMENTS PAR MM³				
		avant	½ h.	1 h.	3 h.	24 h.
1 kg 600	2	320	310	280	300	410
2 kg	4	285	270	250	310	380
2 kg	9	340	320	290	285	340
1 kg 900	9	260	270	250	280	310
2 kg 100	10	320	260	245	290	490
1 kg 800	20	300	270	230	+	
2 kg	30	380	300	+		

TABLEAU II

Effets de l'injection intra-veineuse de sérums pathologiques. sur le taux des thrombocytes d'un animal (lapin).

	POIDS	DOSES	NUMÉRATION DES THROMBOCYTES				LÉSIONS HÉMORRAGIQUES
			avant	½ h.	1 h.	3 h.	
Néoplasme pulmonaire	2	9	406	280	65	+	+
Maladie hém. péri-natale	1,6	8	300	170	40	+	+ + +
Leucose	1,8	9	280	270	250	290	+
Maladie de Kahler	2,4	10	320	280	290	420	—
Anémie hém. acquise	2,2	9	380	110	40	+	—
Purpura thrombo-idopathique	2	9	310	+			—
	1,8	6	280	+			—
	2	5	300	+			—
Purpura allergique	2	9	380	+			—
	1,6	8	410	350	300	+	+ + + +
	2	9	290	180	320	360	—

En effet, l'injection de sérum normal, à la dose de 4 à 5 cm³ par kilo de poids provoque une diminution du taux des thrombocytes, qui atteint au plus 30 %. Par contre, la même dose de sérum pathologique, c'est-à-dire provenant de sujets présentant une thrombopénie de caractère immunologique, amène une chute des thrombocytes, qui est au moins, de 50 %.

A cette dose, il est possible d'observer la mort de l'animal en expérience. Miescher estime que cette mort est causée par la destruction des thrombocytes avec libération d'histamine. Les thrombocytes du lapin seraient, en effet, les seuls à contenir de telles doses d'histamine.

Nous n'avons pas vérifié cette assertion, mais l'étude anatomo-pathologique des lapins nous a montré, dans ce cas, la présence d'hémorragies péritonéales, accompagnées d'un infarcissement rénal. En effet, le lapin présente, avant sa mort, une anurie totale et, à la coupe, macroscopiquement, le rein est noir; on ne peut distinguer de différence entre la zone corticale et la zone médullaire.

Les reins des lapins injectés avec du sérum normal aux mêmes doses ne montrent pas cet infarcissement; tout au plus peut-on noter quelques piquetés noirâtres de la corticale.

Une telle néphrite n'est évidemment pas spécifique des sérums anti-thrombocytes, car l'injection d'une protéine étrangère amène toujours une hématurie chez l'animal en expérience.

Les examens microscopiques nous ont montré que cette différence morphologique était très importante.

Dans le cas d'un lapin normal que nous avons tué trois heures après l'injection de sérum normal, on note « peu ou pas de modifications des cellules des tubes contournés, ce qui indique qu'il n'y a pas d'aspect de néphrite épithéliale appréciable » (examen de M. le Professeur Léger).

Dans le cas d'un lapin tué en soixante-cinq minutes par l'injection de 9 cm³ de sérum de patient atteint de purpura thrombopénique aigu on note les modifications suivantes :

« Rein augmenté de volume. La capsule fibreuse, non adhérente au parenchyme sous-jacent, se libère très facilement. A la coupe, rein rouge, hyperhémié. Les rapports de la substance corticale et de la substance pyramidale sont conservés.

» Examen histologique : A côté d'un certain degré de congestion accompagné par endroits d'exsudation sanguine, on note la présence de microfoyers hémorragiques. Tous les tubes contournés sont lésés à différents degrés. Ils présentent des lésions dégénératives du type de :

Tuméfaction trouble;
Dégénérescence vacuolaire;
Dégénérescence granuleuse.

» Leur lumière est encombrée de masses albumineuses coagulées et de débris cellulaires de cylindres hyalins et granuleux en voie de formation. Les contours des cellules se fondent en une masse uniforme et leurs noyaux désorientés, disposés sans ordre, sont, pour la plupart, altérés.

» En conclusion : les lésions tubulaires constatées sont en faveur d'une néphrite épithéliale aiguë. » (Médecin-Commandant Grenier de Cardenal).

En résumé. — L'injection d'une dose de 4 à 5 cm³ de sérum pathologique/kg de poids permet de noter une chute du taux des thrombocytes significative, qui est toujours d'au moins 50 % : alors que la même dose de sérum normal ne provoque pas une chute du taux des thrombocytes supérieure à 30 %.

Il peut arriver que le lapin meure d'un choc que Miescher compare au choc anaphylactique; mais il peut aussi survivre, et, dans certains cas, on assiste à la mort du lapin au bout de trois jours par une néphrite anurique.

Un moyen grossier de dépistage des facteurs antithrombocytaires, consiste en l'examen macroscopique ou microscopique des reins. Il y a des degrés dans la néphrite, celle-ci étant, le plus souvent, massive, totale, et atteignant électivement l'épithélium des tubes contournés.

Nous avons recherché la valeur de l'injection intradermique de sérum normal et de sérum pathologique.

Pour cela, nous prenons un lapin dont nous rasons les flancs et nous lui injectons 0,10 cm³ de sérum pathologique. La thrombopénie est moins nette que dans le premier cas, mais cependant significative. Elle atteint le plus souvent 50 %, tandis que l'injection de sérum normal n'amène pas de changement dans le nombre de thrombocytes, ou seulement des variations peu significatives.

De plus, il y a apparition, en une heure, d'une zone érythémateuse, qui atteint souvent un diamètre important, de l'ordre de 2 à 3 cm. Une telle zone réactionnelle ne se produit pas dans le même laps de temps avec le sérum normal.

Ainsi, nous estimons que le test proposé par Miescher présente une certaine valeur, non pas tant au point de vue spécificité qu'au point de vue dépistage des sérums anormaux. Nous l'avons utilisé dans ce but, et nous devons dire qu'il nous a été d'un grand secours.

En résumé. — Le facteur thrombopéniant présent dans le sang des sujets atteints de thrombopénie essentielle, primitive ou secondaire, peut être révélé par le test *in vivo* que nous avons décrit.

II. — *Seconde propriété : le facteur thromboagglutinant.*

Le facteur thrombopéniant *in vivo* est capable, *in vitro*, de provoquer l'agglutination [17, 30, 65] et la lyse des thrombocytes [57].

Nous avons surtout étudié l'agglutination de ces éléments, car l'estimation de la thrombolyse reposant sur une numération des thrombocytes à différents intervalles présente de grandes difficultés. En effet, cette thrombolyse porte sur 10 à 20 % des éléments cellulaires. Or, les difficultés techniques de numération des thrombocytes amènent souvent à considérer qu'une erreur de 10 % en plus ou en moins est normale.

Nous pouvons mettre en évidence la propriété thrombo-agglutinante par deux méthodes : la méthode directe; la méthode indirecte.

A. — Méthode directe.

Elle consiste à mettre en présence des thrombocytes physiologiquement et morphologiquement intacts (1) et le sérum à tester.

De nombreuses techniques ont été décrites qui ne diffèrent que par quelques points de détail. Nous avons suivi, dans nos recherches, la technique de Stefanini [65-66].

Technique. — Une quantité de 0,1 cm³ de suspension de thrombocytes en sérum physiologique normal (300.000 éléments au millimètre cube) est mise dans un tube à hémolyse en présence de 0,1 cm³ de sérum décalcifié, décomplémenté, du sujet à tester.

Ces tubes, siliconés, hermétiquement fermés, sont laissés une heure à la température du laboratoire. A la fin de cette période d'incubation, une centrifugation de deux minutes, à 500 tours-minute, est effectuée, et l'on agite doucement pour remettre les thrombocytes en suspension. On dépose alors une goutte de ce mélange sur une lame siliconée présentant une dépression centrale, et on examine au microscope. L'agglutination est appréciée et la réaction est notée selon les modalités habituelles : négative ou positive : + ou + + ou + + +.

A titre de contrôle, on dépose dans un tube 0,1 cm³ de suspension de thrombocytes et 0,1 cm³ de sérum physiologique normal. La réaction est lue de la même manière : elle ne doit mettre en évidence aucune agglutination.

Une telle méthode nécessite un matériel entièrement sili-

(1) L'intégrité physiologique et morphologique des thrombocytes est une condition indispensable à la sécurité des réactions. En effet, une cause d'agglutination non spécifique se voit lorsque la ponction veineuse a été hésitante, entraînant ainsi une désintégration de la thromboplastine tissulaire, qui a pour effet d'activer l'agglutination thrombocytaire.

coné : pipettes, lames, tubes, doivent être parfaitement hydrofugés. Toute négligence entraîne immédiatement une prise en masse des thrombocytes, ce qui contribue à donner des résultats faussement positifs (1).

Critique. — Les reproches que l'on peut faire à cette technique, en dehors de la nécessité du matériel parfaitement siliconé sont les suivants :

On doit obligatoirement utiliser des suspensions thrombocytaires préparées extemporanément avant chaque expérience : car les thrombocytes, même conservés à basse température, ne demeurent morphologiquement et physiologiquement intacts que pendant quelques heures. Donc, chaque fois, il est nécessaire de prélever du sang à plusieurs sujets, de séparer les thrombocytes des autres éléments figurés, avec tous les aléas que cela comporte, et de faire immédiatement les réactions d'agglutination.

Nous avons essayé de conserver les thrombocytes à 4°, selon la méthode de Tullis [74] : ces éléments gardent une morphologie normale pendant leur conservation, mais leur réchauffement à la température du laboratoire amène dans 8 cas sur 10 une auto-agglutination spontanée, irréversible.

Nous avons aussi essayé de conserver les thrombocytes en utilisant la gélatine à 2 % (qui est fluide à 37° et solide à 4°) comme surface protectrice. Mais la présence de cet élément protéinique gêne la réaction, qui perd ainsi de sa spécificité [74].

D'autre part, le test nécessite des sérums parfaitement décomplémentés, décalcifiés, ou déprothrombinés, la moindre trace de calcium entraînant une agglutination et la présence du complément amenant une lyse des thrombocytes dans le cas des réactions positives [57].

---

(1) L'examen au microscope des lames siliconées montre que la surface n'en est pas parfaitement lisse. En effet, on note, çà et là, de petites gouttelettes de silicone sur lesquelles semblent être fixés des agglutinats thrombocytaires. Mais une très légère agitation permet de voir que les agglutinats ne sont pas fixés et que ces gouttelettes ne sont pas le point de départ d'une réaction faussement positive.

B. — ***Méthode indirecte : Hémagglutination passive.***

Nous avons pu juger que les réactions d'agglutination directe des thrombocytes nécessitent un luxe de précautions qui rendent leur application difficile, et leurs résultats douteux, ou, tout au moins, suspects.

De plus, il est probable que ces anticorps antithrombocytaires sont du même type que ceux déjà connus en immunologie, c'est-à-dire complets ou incomplets.

Certains auteurs ont donc cherché une réaction à la fois plus spécifique, plus sensible et pouvant être reproduite facilement : ils se sont adressés à la propriété que possèdent les hématies de fixer diverses substances [54-55]. Ceci est connu depuis longtemps déjà, mais n'a été utilisé que dans ces dernières années, pour la mise en évidence des anticorps.

L'hématie sert de support à l'antigène qu'on lui apporte, mais ce ne sont pas ses constituants qui entrent en réaction. L'hématie joue un rôle passif. Par ailleurs, l'érythrocyte ne fixe pas nécessairement tous les antigènes sans distinction : on sait que les hématies normales semblent impropres à fixer des antigènes de nature protéique [39]. Mais il est possible se fixer de tels antigènes sur l'hématie si on les soumet, au préalable, à l'action de l'acide tannique (Boyden) [12].

Cette technique d'hémagglutination passive a été appliquée à l'étude des anticorps anti-thrombocytes par Kissmeyer-Nielsen [41] : nous avons utilisé cette technique.

Principe.

Des érythrocytes humains sont tannés, puis mis à incuber avec des extraits plaquettaires. Une suspension en sérum physiologique de ces érythrocytes tannés, antigénés, est mise à incuber avec les sérums à étudier. Les résultats sont lus comme des tests d'hémagglutination.

Eléments entrant dans la réaction :

Acide tannique (Rhône-Poulenc) à 1/40.000, dont on prépare chaque jour une solution fraîche à partir d'une solution

mère 1/200, en sérum physiologique normal conservé une semaine au plus à 4° C.

Erythrocytes. — Proviennent du sang défibriné (1) de donneurs O Rh négatif, conservé à 4° C. dans leur sérum, quatre jours au maximum.

Antigènes extraits des thrombocytes. — Des suspensions de thrombocytes prélevés selon les techniques décrites sont congelées (— 25° C.) et décongelées (+ 20° C.) trois fois, broyées, et centrifugées à 3.000 tours-minute pendant trente minutes. Le liquide surnageant constitue « l'antigène thrombocytaire »; il est conservé au congélateur à — 20° C.

Sérums à titrer. — Inactivés par chauffage à 56° pendant trente minutes et conservés à — 20° avant utilisation

Eau physiologique tamponnée :

pH 7,2. — 4 volumes d'eau physiologique normale; un volume de M/15 de KH_2PO_4 et $Na2HPO_4$ dans la proportion nécessaire pour avoir un pH 7,2.

pH 6,5. — 1 volume d'eau physiologique normale et 1 volume de M/15 KH_2PO_4 et $Na2HPO_4$, mélangés pour produire un pH 6,5.

Technique.

Tannage. — Les hématies sont lavées trois fois en eau physiologique, puis mises en suspension à 5 % en eau physiologique tamponnée à pH 7,2. Un volume de cette suspension est mélangé à un volume égal d'acide tannique à la concentration de 1/40.000. On procède à une incubation de dix minutes à la température du laboratoire. Après tannage, les hématies sont lavées une fois en eau physiologique tamponnée à pH 7,2 et mises en suspension à 10 % en eau physiologique.

(1) Les hématies sont obtenues à partir de sang défibriné pour éviter de souiller les préparations par les thrombocytes du donneur.

Sensibilisation des érythrocytes tannés au moyen de l'antigène. — Un volume de cette solution d'érythrocytes tannés est mélangé à un volume d'antigène thrombocytaire tamponné à pH 6,5 et mis à incuber dix minutes à la température du laboratoire.

Les érythrocytes ainsi traités sont centrifugés pendant cinq minutes à 1.000 tours-minute, puis lavés deux fois en eau physiologique. On les met à nouveau en suspension en eau physiologique.

Tests d'hémagglutination. — 0,1 cm³ de sérum pur et de chacune de ses dilutions (dilutions géométriques) est mélangé à 0,1 cm³ d'érythrocytes tannés antigénés dans des tubes à hémolyse et mis à incuber à la température du laboratoire. On agite trente minutes après l'addition des érythrocytes et la lecture a lieu deux heures après. Une seconde lecture est faite douze heures après une mise à la glacière à 4° C.

Contrôle.

1° Contrôle des érythrocytes tannés : Les hématies tannées sont mises en présence d'un volume d'eau physiologique.

2° Contrôle des hématies tannées antigénées : 0,1 cm³ d'hématies tannées antigénées est mis au contact de 0,1 cm³ d'eau physiologique.

3° Enfin pour éliminer la présence d'anticorps spécifiques ou non spécifiques, les érythrocytes n'ayant subi aucune préparation, les érythrocytes tannés sont mis au contact du sérum décomplémenté du donneur dont ils proviennent.

Critiques.

Telle est la méthode de Boyden adaptée par Kissmeyer-Nielsen à l'étude des anticorps anti-thrombocytaires. Elle paraît claire, mais, néanmoins, sa mise au point nous a posé à chaque étape un certain nombre de problèmes.

Problèmes posés par le tannin. — Une visite à la Station œnologique de Bordeaux nous a permis de noter immédiate-

ment que sous le terme de tannin on englobait un grand nombre de produits différents par le mode d'extraction, le degré de pureté. Aimablement, le directeur nous remettait toutes sortes de « tannins » plus ou moins purs ou purifiés. Nous avons donc été obligé de chercher le produit donnant les meilleurs résultats. Les expériences ont montré que les produits les plus purifiés (acide digallique, etc.) étaient ou inactifs à la concentration de 1/40.000, ou hémolysants à des concentrations plus élevées.

Après de nombreux essais, le meilleur produit nous a paru être le tannin à l'éther de la Maison Rhône-Poulenc.

Autres remarques.

Le maintien du pH dans une zone bien délimitée est une condition primordiale de réalisation du test. En effet, en opérant en milieu acide, le tannage amène une agglutination irréversible des érythrocytes; par contre, à un pH de 7,2, la resuspension en eau physiologique ne présente aucune difficulté [12].

De même, la sensibilisation des hématies doit se faire à un pH faiblement acide de 6,5 pour éviter, là aussi, toute agglutination [12].

Nous avons pu noter aussi la nécessité de conserver la solution-stock de tannin dans un bouteille colorée, à l'abri de la lumière; sans cette précaution, on peut observer, au bout de cinq à six jours de conservation, une chute de l'activité de notre solution-stock d'acide tannique.

Les difficultés techniques que nous avons décrites plus haut ne paraissent, à notre avis, que des difficultés mineures. La grande critique que l'on peut faire à la technique de Boyden vient de l'antigène supposé être extrait des thrombocytes. En effet, les auteurs croient à sa nature protéique; mais nous ignorons tout ou à peu près de la structure moléculaire de ces protéines.

L'extraction de l'antigène, telle que nous l'avons décrite, est très grossière. Congélations et décongélations successives

tendent à faire éclater les thrombocytes, mais cet éclatement n'est pas total; ainsi que nous l'a signalé B. Maupin, une simple lame montre, parmi la purée d'éléments lysés, un certain nombre de thrombocytes morphologiquement intacts, qui, ainsi, n'ont pas libéré leurs constituants. De plus, cette technique brutale ne respecte certainement pas la constitution moléculaire intime, à coup sûr, un tel éventail de températures est préjudiciable à certains constituant protéiques.

Kissmeyer-Nielsen, dans son travail, émettait l'hypothèse que la destruction des thrombocytes au moyen des ultra-sons permettrait un meilleur isolement des constituants.

Grâce à l'amabilité de M. le Professeur Piffault, nous avons pu soumettre à l'action des ultra-sons une suspension plaquettaire. Si, macroscopiquement, un plus grand nombre d'éléments semblaient détruits, nous devons constater l'échec total de cet antigène dans la méthode de Boyden. Les sérums décomplémentés pathologiques ou normaux de groupes sanguins différents ont exactement donné les mêmes réactions. S'agit-il d'une élévation thermique trop marquée ou d'une destruction moléculaire trop intense dues aux ultra-sons ? Nous ne pouvons préciser la raison de cet échec.

Avec la composition non définie de cet « antigène » thrombocytaire, un autre élément de trouble est amené par la *concentration.*

Le Médecin-Commandant B. Maupin nous avait remis 8,3 grammes de thrombocytes lyophylisés, soit 50 millions d'éléments au millimètre cube. Des tâtonnements successifs nous ont permis de voir l'importance de la concentration en antigène dans la technique de Boyden. Avec les mêmes sérums décomplémentés :

— 25.000.000 *de plaquettes au millimètre cube :* pas d'agglutination.

— 10.000.000 *de plaquettes au millimètre cube :* agglutination douteuse.

— *Entre* 1.000.000 *et* 600.000 : la réaction nous a semblé la plus fidèle et avec le plus grand éventail de dilutions.

Ce fait était déjà noté par Kissmeyer-Nielsen [41], mais aucune explication n'en est donnée : la concentration trop forte donne-t-elle un phénomène de zone, ou alors devons-nous incriminer la composition même de cet antigène ?

B. Maupin nous avait signalé que l'on pouvait faire disparaître l'opalescence de la solution de thrombocytes lysés par ultracentrifugation; cette opalescence étant due aux granules du chromomère des thrombocytes.

L'ultracentrifugation, suivie d'une électrophorèse du liquide surnageant, permettait de voir un pic de γ globulines isolé, alors que, sans ultracentrifugation, on obtenait une tache non définie, causée par l'immobilité des granules du chromomère, qui ne pouvaient diffuser.

Or, nous avons remarqué qu'après contact avec les hématies tannées le liquide surnageant avait perdu son opalescence et était devenu limpide.

A trop forte concentration, les granules du chromomère des thrombocytes recouvrent-ils toute la surface de l'hématie et empêchent-ils la fixation de l'antigène ? Nous ne pouvons le préciser.

Les objections dues à la composition de l'antigène thrombocytaire nous montrent donc que la technique de Boyden, adoptée par Kissmeyer-Nielsen à l'étude des thrombocytes, n'est qu'une technique grossière. L'ignorance dans laquelle nous sommes de la substance ou de la « molécule » en réaction amène à faire des réserves sur la valeur de ce test.

Cette technique ne doit pas avoir une valeur absolue, mais doit être interprétée en accord avec la clinique et les autres techniques de laboratoire.

CHAPITRE III

ETUDES THROMBOCYTAIRES CHEZ LES SUJETS NORMAUX

Nous avons vu, dans le chapitre précédent, les effets de l'injection à l'animal de sérums humains normaux. Nous ne reviendrons pas sur cette étude, et nous relaterons ici les résultats obtenus au moyen des deux autres méthodes. Enfin, nous expliquerons par quels moyens nous avons pu mettre en évidence dans les thrombocytes l'antigène D du système groupal Rhésus.

La communication de Moureau [53] décrivant la présence des antigènes A et B dans les thrombocytes par une technique différente de la nôtre nous a permis de travailler sur une base précieuse et solide.

I. — *Détection des antigènes A et B.*

Matériel.

Les sangs normaux et les suspensions thrombocytaires utilisés dans ce travail provenaient de donneurs réguliers du Centre de Transfusion sanguine. Aucune considération d'âge ou de sexe n'a présidé à leur choix. Nous avons cependant prêté attention à la détection d'agglutinines régulières à des taux normaux. Ainsi, nous avons éliminé de notre étude un donneur du groupe O, donneur universel dangereux, qui, à la suite d'une vaccination récente, présentait un taux d'agglutinine anti-A très élevé.

Nous avons aussi utilisé quelques sérums provenant du groupage Rh systématique des femmes enceintes, qui est effectué au Centre régional de Transfusion sanguine. Nous avons cependant établi une distinction : nous ne nous som-

TABLEAU III

Résultats des réactions d'agglutination directe et indirecte entre suspensions thrombocytaire et sérums de sujets normaux.

Sérums testés	SUSPENSIONS THROMBOCYTAIRES								
	O +	O +	O —	A +	A +	A +	A —	B +	AB +
O +		—	—	+	+	+	+	+	+
O +	—		—	+	+	+	+	(±)	+
O —	—	—		+	+	+	+	+	+
O —	—	—	—	+	+	+	+	+	+
A +	—	+	—		—	—	—	+	+
A +	—	—	—	—	—		—	(+)	+
A +	—	—	—	—	—	—	—	+	+
A +	—	—	—	—	—	—	—	+	+
A —	—	—	—	—	—	—	—	+	+
A —	—	—	—	—	—	—	—	+	+
A —	—	—	—	—	—	—	—	+	+
B +	—	—	(±)	+	+	+	(+)		+
B +	—	—	+	+	+	+	+	—	+
AB +	—	—	—	—	—	—	—	—	

1° Nous n'avons pas recherché les agglutinations entre sérum et thrombocytes d'un même donneur.
2° Les signes entre parenthèses indiquent une divergence entre les résultats des méthodes d'hémagglutination directe et indirecte.

mes servis que de sérums provenant de primipares n'ayant jamais reçu de transfusions.

A. — La méthode d'agglutination directe.

Nous avons effectué tous les contrôles microscopiques des suspensions thrombocytaires.

Nous avons ajusté ces suspensions thrombocytaires à un taux de 300.000 éléments au millimètre cube. Les lectures ont été faites au microscope et chaque analyse a été exécutée au moins en double.

Les résultats obtenus dans une série d'expériences qui, au point de vue technique, ne peuvent prêter à critique, sont résumés dans le tableau ci-contre. Ils portent sur 9 suspensions thrombocytaires provenant de:

— deuxdonneurs O Rh +;
— un donneur O Rh —;
— trois donneurs A Rh +;
— un donneur A Rh —;
— un donneur B Rh +;
— un donneur AB Rh. +.

Ainsi que sur quatorze sérums [1], dans le détail suit :

— deux donneur O Rh +;
— deux donneurs O Rh —;
— quatre donneurs A Rh +;
— trois donneurs A Rh —;
— deux donneurs B Rh +;
— un donneur AB Rh +.

L'étude critique de ces résultats montre à peu de choses près une identité entre les groupes sanguins des hématies et des thrombocytes du donneur : nous disons à peu de choses près, car l'on peut voir, par exemple, que le sérum n° 5 provenant d'un donneur A Rh + agglutine la suspension thrombocytaire n° 2 provenant d'un donneur O Rh +. Un tel fait nous semble un peu anormal, mais malgré toutes les précautions techniques prises dans l'exécution de ces recherches, nous devons, encore une fois, signaler l'extrême délicatesse des thrombocytes entrant en réaction.

---

(1) Dans une autre série d'expériences utilisant les mêmes suspensions thrombocytaires, les réactions ont été très fortement positives à l'aide de sérums-tests concentrés anti-A et anti-B.

Nous devons signaler que parmi les résultats non insérés ici, nous avons pu rendre positives des réactions d'agglutination par le simple fait de l'abandon, durant vingt minutes, de la lame siliconée sur la platine du microscope.

Malgré tous ces faits, nous devons estimer que cette réaction est précieuse, juste, mais qu'il convient de n'en interpréter les résultats que par comparaison avec la technique d'hémagglutination passive indirecte de Boyden, dont nous allons maintenant donner les résultats.

B. — L'hémagglutination passive.

Nous avons utilisé les mêmes suspensions thrombocytaires et les mêmes sérums. De plus, nous avons effectué une expérience en utilisant, comme source d'antigènes, une suspension de thrombocytes lyophylisés qui nous avait été aimablement remise par B. Maupin. Cette suspension thrombocytaire provenait du sang d'une quarantaine de donneurs de tous groupes.

Avec nos préparations d'antigènes, nous avons obtenu des réactions d'hémagglutination dont les résultats sont identiques à ceux acquis par la technique d'agglutination directe.

Mais on doit constater que l'extraction grossière de l'antigène ne permet pas d'obtenir des réactions d'agglutination aussi importantes que celles obtenues dans d'autres réactions biologiques d'hémagglutination passive appliquées aux diagnostics bactériologiques (réactions d'hémagglutination de la peste par exemple) [56].

Quoi qu'il en soit, les résultats obtenus par la méthode de Boyden sont précis; plus précis que ceux auxquels aboutit la méthode d'agglutination directe; avec l'antigène extrait de la suspension thrombocytaire de B. Maupin (1), nous avons vu que les sérums provenant de sujets du groupe AB ne pouvaient agglutiner les hématies tannées antigénées, alors qu'avec les autres sérums on obtenait une agglutination.

---

(1) Antigène qui, selon toute vraisemblance, du fait de son origine, devrait constituer un éventail immunologique très vaste.

Ceci nous semble confirmer, en particulier, la présence d'antigènes A et B dans les thrombocytes, car les sérums de sujets AB ne contiennent pas d'anticorps anti-A et anti-B.

C. — Critique de ces expériences.

Malgré les résultats positifs obtenus, nous ne pouvons nous empêcher de critiquer ces deux méthodes de détection des agglutinines thrombocytaires.

Pour la technique d'agglutination directe. — Nous rappellerons le reproche déjà fait à cette méthode : c'est-à-dire la nécessité de préparations extrêmement soigneuses, et chaque fois répétées, de l'antigène.

Pour la technique d'hémagglutination indirecte. — Nous avons signalé dans le mode de préparation de « l'antigène thrombocytaire » la grossièreté de l'extraction. Un éventail si large de températures lèse à coup sûr certaines liaisons lipoprotéiques : de plus, une partie seulement des protéines passe en solution.

II. — *Détection de l'antigène D du système groupal Rhésus.*

Cette objection, reposant essentiellement sur des considérations chimiques, s'est trouvée confirmée lorsque nous avons essayé d'expliquer les résultats bizarres obtenus avec le sérum d'un sujet AB Rhésus négatif, que nous supposions ne pas posséder d'anticorps immuns.

Résumons les résultats dans le tableau ci-dessous :

Suspensions de thrombocytes	O+	O+	O—	A+	A+	A+	A—	B+	AB+
Sérum AB Rh—	+	+	—	+	+	+	—	+	+

Un tel sérum ne contient pas d'agglutinines naturelles anti-A et anti-B et ne peut donc entrer en réaction avec des antigènes du système de groupe sanguin A.B.O.

Une enquête rapide nous permit d'apprendre que le donneur Ran... (Marius) était AB Rh négatif (cde/cde) immunisé

volontairement au moyen de l'antigène D, afin d'obtenir un sérum test anti-D.

Cette constatation paraissait être une preuve de la multiplicité antigénique des thrombocytes.

Pour le démontrer, nous nous sommes adressé à la technique d'absorption sérique que le Professeur Moureau, de Liége, a utilisée pour mettre en évidence la présence d'antigène A et B dans les thrombocytes.

Le principe est le suivant : Un sérum test est mis au contact d'une suspension très concentrée de thrombocytes broyés. Si les thrombocytes contiennent l'antigène entrant en combinaison avec l'anticorps du sérum-test, il se produit une diminution importante de l'activité du sérum-test. Cette diminution traduit d'absorption de l'anticorps spécifique par l'antigène correspondant.

Nous avons suivi le protocole indiqué ci-dessous :

Deux volumes de suspension de thrombocytes broyés sont mis au contact d'un volume de sérum-test dont l'activité a été titrée auparavant. Après quarante-huit heures d'incubation à 4° C., nous n'avons obtenu aucune diminution de l'activité du sérum test vis-à-vis d'hématies Rh + sensibilisées par un enzyme protéolytique.

Nous rappelant que le sérum anti-D avait une activité variant en fonction directe de la température, nous avons mis à incuber le mélange au bain-marie à 37° C. pendant trois heures.

Les résultats obtenus avec le sérum initial et le sérum absorbé vis-à-vis d'hématies O Rh + papaïnisées sont les suivants :

Dilutions des sérums ..	1	2	4	8	16	32	64	128
Sérum test	++++	++++	++++	++++	+++	++	+	0
Sérum Test absorbé ...	++++	++	(+)	0	0	0	0	0

Une telle diminution de l'avidité du sérum-test en expérience nous autorise à admettre la présence vraisemblable de

l'antigène D du système groupal Rhésus dans les thrombocytes.

Ce fait confirme une fois encore nos pensées sur la mosaïque d'antigènes que représente vraisemblablement « l'antigène thrombocytaire » extrait par la méthode de congélations et décongélations successives.

Si nous l'appliquons aux phénomènes pathologiques, cette constatation nous permet de penser qu'un anticorps anti-D d'une femme immunisée entre en conflit avec non seulement les érythrocytes, mais encore les thrombocytes du fœtus qu'elle porte.

Ce conflit entraîne une thrombocytolyse et permet d'expliquer ainsi certains aspects hémorragiques jusque-là inexpliqués de la maladie hémolytique périnatale.

CHAPITRE IV

APPLICATION DES TECHNIQUES DE DETECTION DES FACTEURS ANTI-THROMBOCYTAIRES AUX PHENOMENES IMMUNOLOGIQUES LIES AUX THROMBOCYTES

La présence, dans les thrombocytes, de facteurs antigéniques, dont trois au moins ont été isolés (facteurs A et B découverts par Moureau, facteur D que nous avons nous-même mis en évidence), laisse à penser que des phénomènes d'immunisation anti-thrombocytaire sont possibles entre individus de constitution antigénique thrombocytaire différente.

Sachant que les voies d'introduction des antigènes érythrocytaires chez un individu sont essentiellement représentées par la voie intraveineuse et la voie transplacentaire, il est très vraisemblable que des anticorps anti-thrombocytaires peuvent être élaborés lorsque les antigènes thrombocytaires sont introduits par des mêmes voies.

Si de tels phénomènes se produisent, il se trouve créé un état *d'iso-immunisation anti-thrombocytaire*. Lorsque, dans un temps ultérieur, les facteurs anti-thrombocytaires élaborés seront accidentellement ou physio-pathologiquement introduits dans un organisme sensible (c'est-à-dire un organisme dont les thrombocytes portent l'antigène correspondant), il se produira une réaction antigène-anticorps aboutissant à la lyse des thrombocytes.

D'autres phénomènes immunologiques peuvent survenir qui relèvent d'une *auto-immunisation anti-thrombocytaire*. Dans de tels cas, l'anticorps élaboré est nocif pour les propres thrombocytes du sujet immunisé.

I. — *Les thrombopathies par iso-immunisation.*

Les antigènes thrombocytaires peuvent, accidentellement, être introduits dans un organisme par deux voies : la voie intraveineuse et la voie transplacentaire. Dans les deux cas, la sollicitation antigénique peut aboutir à l'élaboration d'anticorps immuns.

A. — Voie intraveineuse.

La description de groupes sanguins thrombocytaires différents des groupes sanguins des hématies pouvait faire craindre la posibilité d'une immunisation anti-thrombocytaire lors de transfusions répétées. Le souvenir d'accidents transfusionnels inexpliqués avant la découverte du facteur Rhésus autorisait une telle hypothèse.

Afin d'étudier la possibilité d'une immunisation anti-thrombocytaire post-transfusionnelle, nous avons examiné douze sérums de sujets polytransfusés dont le détail suit :

— Cas n^{os} 1 à 7 = 7 sujets ayant reçu de 4 à 7 transfusions isogroupes érythrocytaires;
— Cas n° 8 = 1 sujet ayant reçu 11 transfusions isogroupes érythrocytaires;
— Cas n° 9 = 1 sujet ayant reçu 32 transfusions isogroupes érythrocytaires;
— Cas n° 10 = 1 sujet ayant reçu 45 transfusions isogroupes érythrocytaires;
— Cas n° 11 = 1 sujet ayant reçu 85 transfusions isogroupes érythrocytaires;
— Cas n° 12 = 1 sujet ayant reçu 110 transfusions isogroupes érythrocytaires.

a) Cas n^{os} 1 à 7. — Ces sérums provenaient d'opérés qui, jamais auparavant, n'avaient reçu de sang par voie intraveineuse ou intramusculaire. Nos recherches ont été effectuée environ trois semaines après la dernière transfusion : ceci afin de permettre l'élaboration de l'anticorps anti-thrombocytaire et d'éviter la cause d'erreur pouvant provenir de la thrombocytose survenant au 10^{e} jour après intervention chirurgicale [40].

Les sérums de ces sujets n'ont jamais provoqué chez l'animal de chute du taux des thrombocytes supérieure à 20 %. Les tests d'agglutination thrombocytaire directe ou indirecte n'ont jamais montré la présence d'anticorps immuns.

b) Cas n° 8. — Ce malade (M. de L...) avait été amputé des deux jambes à la suite d'un accident et avait reçu en urgence 1 litre 1/2 de sang O Rh + et, après groupage sanguin, du sang iso-groupe A Rh +. Au total, il avait reçu 11 transfusions. Toutes les épreuves biologiques ont été négatives.

c) Cas n^{os} 9, 10, 11, 12. — Il s'agit de malades qui non seulement ont reçu de nombreuses transfusions (respectivement, 32, 45, 85 et 110), mais encore présentaient une thrombopénie notable. Trois d'entre eux (obs. n^{os} 10, 11, 12) présentaient un syndrome d'auto-agression caractérisé par un état hémolytique secondaire avec auto-anticorps anti-érythocytaires. Ils feront l'objet d'une étude particulière au paragraphe B : thrombopathies par auto-immunisation, car la présence d'auto-anticorps de spécificité indéfinie ne permet pas de déceler parmi eux les iso-anticorps anti-thrombocytaires susceptibles d'avoir été créés par les transfusions répétées.

Mais l'observation n° 9 concerne un sujet thrombopénique polytransfusé dont la diminution du taux des thrombocytes ne peut être mise sur le compte d'une auto-agression.

Cas n° 9. — G. L..., 48 ans, présentait un néoplasme pulmonaire, inextirpable chirurgicalement. Il fut traité par radiations. Une anémie assez importante conduisit à transfuser le malade avec du sang iso-groupes. L'examen hématologique montrait une thrombopénie à 80.000 éléments au millimètre cube, une anémie à 2.600.000 hématies/millimètre cube. Une leucocytose à 18.000 leucocytes au millimètre cube, pouvait être expliquée par une infection pulmonaire surajoutée.

Étude immuno-thrombocytaire.

La diminution du taux des thrombocytes produite chez l'animal par injection intraveineuse était de 35 %. Nous n'avons pu mettre

en évidence des anticorps immuns antithrombocytaires par les méthodes d'agglutination directe ou indirecte.

En conclusion : aucun des sérums provenant de sujets poly-transfusés n'est apparu posséder des anticorps anti-thrombocytaires.

B. — Voie transplacentaire.

Un exemple particulièrement intéressant de conflit immunologique fœto-maternel est fourni par le purpura thrombopénique congénital dont le schéma pathogénique a été établi par Harrington et collaborateurs [30]. En voici la description donnée par Soulier [63] :

Une femme atteinte de thrombopénie essentielle, qu'elle soit ou non splénectomisée, présente habituellement une recrudescence d'hémorragies dans les derniers mois de la grossesse. Tout se passe (si la mère avait été auparavant splénectomisée) comme si la rate du fœtus venait remplacer la rate absente de la mère pour recréer la diathèse hémorragique. Dans près de 25 % des cas, l'enfant meurt avant ou au moment de l'accouchement. Lorsqu'il est vivant à la naissance, le chiffre de ses plaquettes est réduit, et il présente souvent un syndrome hémorragique. S'il survit à ces hémorragies, ce qui est habituel, on assiste à une guérison spontanée et définitive de la thrombopénie. Il ne présentera plus jamais de rechutes. Il n'est donc pas atteint d'une maladie héréditaire : il est seulement victime de l'action d'un facteur thrombopéniant d'origine maternelle, qui ne se forme qu'en présence d'une rate normale.

Nous n'avons pas rencontré de tels syndromes, mais nous avons pu déceler un cas de thrombopénie immunologique due au facteur Rhésus.

Observation n° 13. — Enfant F. S... Il s'agit d'un nouveau-né atteint de maladie hémolytique périnatale qui présente, en outre, à la naissance, un tableau hémogénique : taches purpuriques disséminées sur tout le corps, particulièrement importantes au niveau du visage; saignement au point de piqûre; thrombopénie à 20.000 éléments au millimètre cube. Au point de vue érythrocytaire :

test direct de Coombs positif (+ + + +); groupe O Rh +. Dans le sérum : présence d'anticorps anti-Rh libres au taux de 4 unités.

Etude immuno-thrombocytaire.

a) *Test de Miescher.* — Nous avons effectué ce test malgré la présence d'une hémolyse notable dans le sérum sanguin. L'injection de 8 cm³ dans la veine marginale de l'oreille a tué le lapin en une heure cinquante minutes avec une thrombopénie importante.

— Examen anatomo-pathologique : A l'ouverture de l'abdomen, on note la présence d'environ 3 à 4 cm³ d'une sérosité rougeâtre; de même à l'ouverture de la plèvre. Les reins sont noirâtres, augmentés de volume, et macroscopiquement, il n'est pas possible de faire une distinction entre zone corticale et pyramidale. L'examen microscopique effectué (Médecin-Commandant Grenier de Cardenal) montre : « Aucun élément morphologiquement intact; aspect de néphrite épithéliale massive avec nombreuses suffusions hémorragiques ».

— L'injection intradermique de 0,1 cm³ de sérum pathologique entraînait en cinquante minutes l'apparition d'un œdème érythémateux d'environ 1,5 cm. de diamètre. La thrombopénie n'a pas été recherchée, car, en même temps (à titre de témoin), sur l'autre flanc de l'animal, nous avons effectué l'injection de 0,1 cm³ de sérum anti-Rh prélevé chez un autre sujet immunisé. Ce témoin restait négatif (absence d'œdème).

b) *Techniques d'agglutination directe et indirecte.* — Ces techniques nous avaient donné, à l'époque de nos recherches, des résultats positifs avec toutes les suspensions. Recherchant à cette époque des sérums pour le groupage thrombocytaire, nous avions écarté ces résultats obtenus avec des thrombocytes de groupes sanguins différents (mais tous Rhésus positifs).

La mise en évidence de l'antigène D du système groupal Rhésus, par une technique d'absorption sérique, nous a conduit à considérer ces résultats comme valables et à admettre que l'immunisation anti-D peut non seulement toucher les érythrocytes, mais encore

les thrombocytes, éclairant ainsi d'un jour nouveau la pathogénie obscure de certains syndromes hémorragiques de la maladie hémolytique périnatale.

II. — *Thrombopathies par auto-immunisation.*

De nombreux points sont encore inconnus dans l'étude de l'auto-immunisation anti-thrombocytaire. On ignore si les anticorps anti-thrombocytes sont la cause de la maladie ou son témoin, et surtout comment l'organisme peut créer une auto-sensibilisation à ses propres thrombocytes.

Quoi qu'il en soit, nous étudierons ces thrombopathies en les divisant en thrombopathies secondaires, essentielles, allergiques.

A. — Les thrombopathies secondaires.

La thrombopathie n'est que le signe d'accompagnement tardif, souvent terminal, d'un syndrome clinique malin : telles sont les thrombopénies des hémopathies malignes.

Nous avons étudié les sérums de trois sujets atteints d'hémopathies malignes. Il s'agit des observations n°s 10, 11, 12.

Observation n° 10. — M. Bu... (T.) présentait une leucose subaiguë à prédominance myélocytaire ayant évolué vers la leucose aiguë blastique. L'évolution totale apparente s'est effectuée en quatre mois. Le début apparent se produit en janvier 1954. Vers le mois de mars 1954, au moment où l'on constate la transformation blastique de la maladie, se révèle un syndrome hémorragique avec épistaxis, gingivorragies, pétéchies, ecchymoses sous-cutanées spontanées, saignement abondant au point de piqûre.

Le signe du lacet est positif : + + + + ; le temps de saignement, très allongé : au-delà de vingt minutes; la thrombopénie importante : 30.000 éléments au millimètre cube. Le sujet reçoit comme traitement des transfusions répétées d'hématies déplasmatisées (45 lors de nos examens). Le malade meurt le 20 mai 1954, dans un syndrome hémorragique.

Examens immuno-thrombocytaires.

— Test de Miescher : L'injection à un lapin de 8 centimètres cubes de sérum par voie intraveineuse ne donne pas de thrombopénie significative. L'animal ne meurt pas et est sacrifié à la quatrième heure. L'examen microscopique du rein montre les mêmes phénomènes de microfoyers hémorragiques.

— Les épreuves d'agglutination thrombocytaire directe et indirecte ne nous ont pas donné de preuves d'existence d'un anticorps anti-thrombocytaire permettant de penser à une thrombopathie, soit par iso-immunisation post-transfusionnelle, soit par auto-immunisation.

Observation n° 11. — M. Gau... (Jean), présentait une maladie de Kahler évoluant depuis trois ans. L'apparition d'une anémie sévère affaiblissant le sujet a conduit à pratiquer des transfusions. Les transfusions de sang total, très mal tolérées, avec céphalées, angoisse, frissons, vertiges, ont été très vite abandonnées, et ont été remplacées par des transfusions d'hématies déplasmatisées qui sont très bien supportées.

L'examen immunologique érythrocytaire montre un test direct de Coombs positif (+ + + +) et la présence d'un pan-anticorps, libre actif à chaud au taux de 1/64. Au mois de février 1954, alors que l'anémie oscille entre 1.500.000 et 2.500.000 hématies par millimètre cube, apparaît un syndrome hémogénique avec nombreuses pétéchies, gingivorragies, épistaxis. Une hématurie importante fut améliorée de façon spectaculaire par une transfusion de sang frais (conservé une heure au maximum en matériel non siliconé). La thrombopénie subsiste, oscillant entre 30.000 et 50.000 éléments au millimètre cube. Le malade décède le 2 juin 1954 dans un syndrome hémorragique.

Examens immuno-thrombocytaires.

Lorsque nos recherches ont été effectuées, le malade avait reçu 85 transfusions.

— Test de Miescher : L'injection intraveineuse de 10 cm³ de sérum amène une chute importante du taux des thrombocytes (de

320.000 à 80.000 éléments au millimètre cube) et tue l'animal en une heure. L'examen anatomo-pathologique du rein de l'animal ne montre « pas de néphrite épithéliale, ni de foyers hémorragiques » (Prof. Léger).

— L'injection intradermique de 0,1 cm³ de sérum ne provoque pas l'apparition d'un œdème érythémateux.

— Agglutination directe : Cette épreuve nous permet de noter une agglutination importante de toutes les suspensions thrombocytaires.

— Hémoagglutination passive. Nous avons obtenu des réactions positives avec tous les « antigènes » thrombocytaires à notre disposition.

Ces résultats nous permettent d'affirmer la présence d'un anticorps immun anti-thrombocytaire.

Observation n° 12. — M. Les... (Jean) présente une anémie hémolytique acquise avec auto-anticorps anti-érythrocytes (pan-anticorps actif à chaud), au taux de 1 à 2 unités. Ce pan-anticorps est décelé seulement de façon épisodique à l'aide d'hématies traitées par un enzyme protéolytique. Cette anémie hémolytique s'accompagne d'une splénomégalie importante : la rate atteint la ligne médiane et plonge dans la fosse iliaque gauche.

L'anémie constante oscille entre 500.000 et 1.800.000 globules rouges au millimètre cube. Elle est difficilement stabilisée à l'aide de transfusions très bien supportées. La thrombopénie est constante (100.000 éléments/mm³). Le sujet présente de façon épisodique un syndrome hémogénique, dont l'apparition coïncide avec la présence d'anticorps circulants.

Examens immuno-thrombocytaires.

— Test de Miescher : 9 cm³ de sérum en injection intraveineuse amènent une importante thrombopénie (380.000 à 40.000 éléments) et tuent l'animal en soixante-cinq minutes.

— L'examen microscopique du rein (Prof. Léger) ne montre « aucune lésion de néphrite épithéliale, aucun foyer hémorragique ».

— Agglutination thrombocytaire directe : Appliquée à toutes les suspensions thrombocytaires en notre possession, cette réaction nous a donné une agglutination massive, presque instantanée, encore positive à la dilution de 1/128.

En utilisant 0,5 cm³ de sérum et 0,5 cm³ de suspension thrombocytaire, l'agglutination est macroscopique et se produit en quatre minutes.

L'hémagglutination passive ne nous a pas permis d'obtenir de tels résultats.

B. — Thrombopathie essentielle.

Observation n° 14. — Mme Rou... (61 ans) est hospitalisée au début de mars 1954, dans le service de M. le Docteur Massières (salle 4, Hôpital Saint-André), pour épistaxis, gingivorragies, ecchymoses sous-cutanées spontanées. La rate est percutable, mais non palpable.

Examen hématologique :

Hématies : 2.400.000 au millimètre cube;
Leucocytes : 7.000 au millimètre cube;
Thrombocytes : 60.000 éléments.

Le temps de saignement est supérieur à trente minutes. Le signe du lacet est positif (+ + + +).

L'absence de néoplasie tissulaire et sanguine, l'irrétractilité absolue du caillot, amènent à porter le diagnostic de purpura thrombopénique idiopathique. Entre temps, l'anémie sévère de la malade avait amené à effectuer des transfusions de sang frais A Rh +. Ces transfusions corrigèrent l'anémie, mais non la thrombopénie; en même temps, on observait une augmentation des phénomènes hémorragiques.

Nous avons recherché la présence de facteurs antithrombocytaires (qui se sont révélés fortement positifs), afin d'effectuer une transfusion de thrombocytes. Sur six donneurs iso-groupes A Rh +, testés par la méthode d'agglutination directe, deux seulement ont présenté une comptabilité thrombocytaire *in vitro*, avec le sérum de la malade. Nous avons donc effectué, le 25 mai, une transfusion de 200 cm³ de plasma enrichi en thrombocytes par centrifugation lente (plus de 600.000 éléments au millimètre cube).

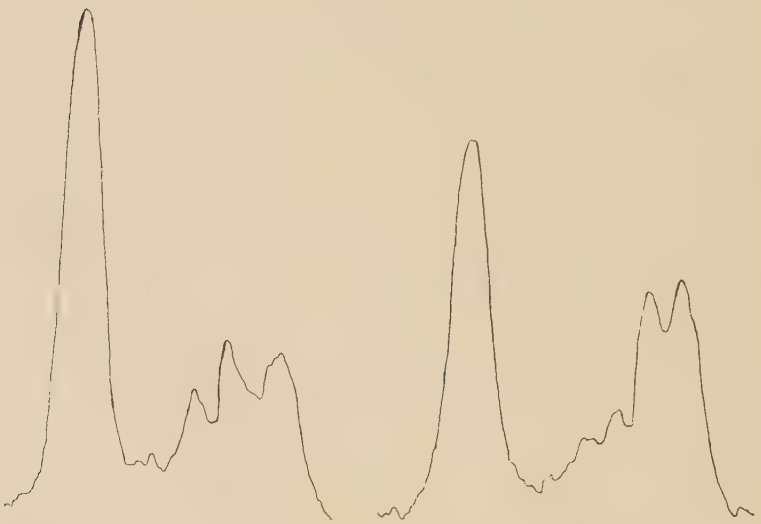
La transfusion fut très bien supportée et les hémorragies s'arrêtèrent rapidement. Le soir même, elles reprenaient, quoique très atténuées; et le surlendemain 27 mai, dans la nuit, la malade décédait dans un tableau hémorragique.

Examens immuno-thrombocytaires.

— Test de Miescher : L'injection intraveineuse de 9, 6, 5 cm³ de sérum à trois animaux a amené leur mort immédiate sans phénomènes hémorragiques.

Par contre, l'injection intradermique de 0,1 cm³ de sérum pathologique au lapin a donné une réaction érythémateuse fortement positive.

Electrophorèses (M. F. Mesnier, sur appareil Titromatic, J. Quéré, constructeur, Bordeaux.)



Sérum normal. Sérum Mme Rou...

Epreuves d'agglutination indirecte : Tous les tests d'hémagglutination passive ont montré des réactions positives avec tous les « antigènes » en notre possession. La présence dans ce sérum d'une

cryoglobuline disparaissant à chaud nous a conduit à faire pratiquer par M. F. Mesnier une électrophorèse, dont nous donnons, ci-contre, les résultats et le diagramme : « Diminution du rapport $\frac{\text{Albumine}}{\text{Globuline}}$ due à une diminution des albumines, et une augmentation des β, mais surtout γ globulines » posant ainsi le diagnostic de *purpura hyperglobulinemica* [80].

C. — Thrombopathie allergique.

Sous ce vocable, on désigne les thrombopathies dans lesquelles l'auto-anticorps anti-thrombocytaire ne peut agir qu'en présence d'une substance contre laquelle l'organisme est sensibilisé [3, 11, 8, 35]. Dans le cas étudié, la substance spécifique en cause est l'allyl-isopropyl-acétyl carbamide (Sédormid) (1).

Observation n° 15. — Tal... (J.), 47 ans, est adressé à la consultation de dermatologie de l'Hôpital militaire Robert-Picqué, pour des ulcérations linguales et gingivales, d'aspect vernissé, saignant par intermittences. Dans ses antécédents personnels, on pouvait noter, en 1938, une première hématémèse révélatrice d'un ulcus gastrique. En 1942, deux nouvelles hématémèses font gastrectomiser ce malade. En 1952, une nouvelle hématémèse oblige à intervenir pour vérifier le moignon gastrique. Au début de 1953, une hémoptysie importante se déclenche. L'examen radiologique montre un infiltrat sous-claviculaire gauche, et, bien que toutes les tentatives de recherche du BK, toutes les inoculations au cobaye, se soient révélées négatives, le malade est envoyé en cure sanatoriale, où il suit un traitement de six mois. Fin 1953, il présente une induration des corps caverneux.

Enfin, avec quelques réticences, le malade signale une insomnie nocturne (quatre heures de sommeil par nuit) avec un syndrome douloureux des jambes (restless legs).

---

(1) L'observation de ce malade a fait l'objet d'une communication : Grenier de Cardenal (J.-L.), Taséi (L.), Moulinier (J.), Darrigol (J.). *Sur un cas d'intoxication chronique à l'allyl-isopropyl-acétyl carbamide* (Sédormid) Soc. de Méd. et de Chir. de Bordeaux, séance du 9 juillet 1954.

Le diagnostic d'allergie au dentifrice fut posé, mais très rapidement abandonné. Un examen hématologique montrant une éosinophilie à 30 % fit penser à une parasitose tissulaire ou intestinale. Cette hypothèse fut infirmée. Un examen hématologique plus poussé fit découvrir une mégathrombocytose (éléments de 5 à 7 μ) et une thrombopénie légère (110.000 éléments au millimètre cube).

Cette thrombodystrophie fit envisager la possibilité d'un syndrome hémogénique, mais un interrogatoire plus serré du malade permit de voir que, depuis 1939, ce dernier prenait, par intermittence, parmi d'autres hypnotiques, du Sédormid (deux comprimés le soir avant le coucher).

L'hypothèse d'une intoxication chronique lente à l'allyl-isopropyl-acétyl-carbamide fut alors soupçonnée. Nous avons, au Laboratoire du Centre régional de Transfusion sanguine, cherché à confirmer ce diagnostic.

Le 15 février 1954, nous avons trouvé : un temps de saignement à quatorze minutes, une rétraction partielle du caillot, et, surtout, un temps de consommation de prothrombine à neuf secondes. En même temps, nous avons appliqué les techniques d'Ackroyd [2, 3, 4] de détection des facteurs antithrombocytaires dans l'allergie au Sédormid. Les résultats obtenus sont les suivants :

1° Les thrombocytes du sujet sont agglutinés par leur propre sérum en présence de Sédormid (taux : 1/512).

2° Toutes les suspensions thrombocytaires isogroupes étudiées ne sont pas agglutinées par le sérum du malade. L'addition de Sédormid entraîne une agglutination.

3° L'addition de complément de cobaye au 1/10 entraîne une lyse des thrombocytes.

De tels résultats indiquent la présence d'un anticorps allergique anti-thrombocytaire, dont l'allergène est le Sédormid. Aussi, la suppression du médicament fut-elle ordonnée. Très rapidement, les ulcérations jugales disparurent, ainsi que l'asthénie; le syndrome d'insomnie resta sans changement [70].

Le 29 mars 1954, un nouvel examen donne les résultats suivants :

Thrombocytes : 320.000 au millimètre cube, de taille normale. Le temps de saignement est à trois minutes. Le temps de consommation de prothrombine est à trente-cinq secondes, traduisant ainsi une normalisation de la crase sanguine.

Les différentes épreuves décrites ont été à nouveau effectuées. Elles se sont révélées positives, mais à un taux plus faible (1/32), traduisant ainsi la diminution d'activité de l'anticorps sérique allergique.

Le 8 juin 1954, le malade ne présente plus de troubles, et a engraissé de 3 kilos: l'insomnie persiste.

Parallèlement à ces examens, nous avons, pour notre part, pratiqué le test de Miescher.

— Le 15 février 1954, l'injection intraveineuse à deux lapins de 9 cm^3 de sérum pathologique entraîne une mort des animaux entre vingt et trente minutes. Aucun signe d'hémorragie macroscopique ou microscopique n'est noté. Par contre, l'injection intradermique a permis de noter une réaction positive (apparition d'œdème érythémateux).

— Le 22 février 1954, lors d'un second prélèvement au malade (arrêt du Sédormid depuis cinq jours), une nouvelle expérience nous permet de noter une diminution du taux des thrombocytes chez l'animal, diminution peu importante. L'animal est tué au bout de deux heures : l'examen anatomo-pathologique, dont le compte rendu a été publié p. 32), note la présence de foyers hémorragiques dans le rein et le foie.

— Le 9 juin 1954, une injection à un animal n'entraîne ni thrombopénie, ni mort de l'animal. Le lapin est sacrifié, et l'examen microscopique note « rein normal ».

Tous ces faits nous ont donc permis d'affirmer une intoxication chronique à l'allyl-isopropyl-acétyl carbamide.

CHAPITRE V.

SYNTHESE ET ESSAIS D'INTERPRETATION DES RESULTATS OBTENUS

Les observations rapportées nous ont permis de noter des différences entre les phénomènes d'agglutination par iso et auto-anticorps anti-thrombocytaires. Ces anticorps anti-thrombocytaires ont sur l'animal non seulement une action thrombopéniante mais encore une action angiotoxique. Cette dualité peut permettre d'expliquer le syndrome purpurique clinique qui accompagne très souvent certaines thrombopathies.

I. — *Syndromes d'iso-immunisation.*

Sous ce vocable, nous avons réuni un certain nombre de cas dont le contexte clinique pouvait faire penser à une possibilité d'iso-immunisation anti-thrombocytaire.

Chez les polytransfusés, nous n'avons pu obtenir de résultats positifs dans la recherche d'iso-anticorps anti-thrombocytes. Une telle possibilité, cependant, ne peut être totalement exclue, car les produits de désintégration des thrombocytes qui se trouvent dans le sang conservé [28, 76] sont vraisemblablement antigéniques [65, 72].

Ce résultat négatif est peut-être dû à l'insuffisance de sollicitation immunologique de l'antigène thrombocytaire.

Il est beaucoup plus vraisemblable que l'identité groupale des hématies et des thrombocytes évite l'induction d'une iso-immunisation anti-thrombocytaire, car une transfusion de sang iso-groupe conduit à une transfusion de thrombocytes iso-groupes.

Cette concordance entre les groupes sanguins des hématies et des thrombocytes nous a permis d'expliquer la thrombopénie, accompagnant, dans certains cas, la maladie hémolytique périnatale. L'anticorps anti-Rhésus des femmes immunisées traverse le placenta et vient se fixer sur les cellules du fœtus. La présence de l'antigène Rhésus dans les thrombocytes (ainsi que nous l'avons montré par une technique d'absorption sérique) permet de penser que l'anticorps anti-Rhésus de la mère peut aussi entrer en conflit avec les thrombocytes.

Par un mécanisme vraisemblablement identique au mécanisme de l'hémolyse des érythrocytes, une thrombolyse se produit entraînant une thrombopénie.

La guérison spectaculaire du purpura clinique, accompagnant les phénomènes hémolytiques intravasculaires que présentait l'enfant étudié, semble confirmer cette hypothèse. En effet, l'exsanguino-transfusion (Dr J. Moulinier) amena une cessation des phénomènes d'hémolyse érythrocytaire et une disparition en quelques jours du lacis purpurique siégeant sur le corps.

Cependant, il nous faut noter qu'une thrombopénie, même importante, n'entraîne pas nécessairement un purpura ou une hémorragie. Il est très vraisemblable qu'un facteur vasculaire est aussi en cause dans le mécanisme de certains syndromes hémorragiques de la maladie hémolytique périnatale.

II. — *Thrombopathies par auto-immunisation.*

L'existence d'une réaction antigène-anticorps, survenant dans un même organisme contre ses propres cellules est maintenant admise. Ces anticorps sériques ont une origine inconnue : on ignore si ces substances sont la cause ou le témoin immunologique de ces maladies [1, 17, 19].

Les réactions entre de tels sérums immuns et les thrombocytes provenant de sujets normaux nous ont donné des

résultats constants : ces sérums agglutinent toutes les suspensions thrombocytaires étudiées. Et il nous a été impossible de trouver des phénomènes d'agglutination superposables à ceux obtenus avec des agglutinines naturelles (agglutinines de groupes).

Une telle constatation peut être expliquée par le mécanisme hypothétique de formation des anticorps. En effet, on pense actuellement que la production des auto-anticorps serait due à une réponse de l'organisme sollicité par un auto-antigène modifié. Cet auto-antigène modifié, inconnu de l'organisme, serait créé sous l'effet d'une altération de la surface des cellules sanguines par des agents extérieurs.

Cette modification antigénique permettrait d'expliquer les agglutinations pathologiques obtenues avec les sérums immuns : ces agglutinines ne sont nullement en rapport avec les antigènes de groupe.

De tels sérums immuns nous ont donné en outre, dans nos expérimentations sur l'animal (lapin), un certain nombre de résultats concordants : la création d'une thrombopénie importante et, surtout, de microfoyers hémorragiques dans les reins de lapins tués par injection intra-veineuse de sérums pathologiques.

Ces faits, parfois dissociés, pourraient être mis sur le compte d'un anticorps hétérophile du type Forssman; Adelson [5] et Stefanini ont noté la présence d'un tel anticorps dans le sérum d'un sujet atteint de purpura thrombopénique idiopathique. Cet anticorps hétérologue agissait seulement sur des thrombocytes hétérologues (chien, lapin, cobaye).

Une telle objection ne peut être faite, car le lapin est le chef de file de « la communauté antigénique ne possédant pas l'antigène Forssman » (Dujarric de La Rivière) [18].

La seule hypothèse qui reste valable pour expliquer les foyers hémorragiques observés chez les animaux mis en expérience est donc l'action spécifiques des sérums immuns vis-à-vis des parois endothéliales elles-mêmes.

Déjà, en 1905, Marino [48] obtenait le premier un sérum

anti-thrombocytes et constatait le pouvoir lytique ou agglutinant *in vitro* de ce sérum pour les thrombocytes ayant servi à l'immunisation. Et, en 1914, Ledingham [42], confirmait les expériences de Sacerdoti [62] (1909), selon lesquelles le sérum de chien antithrombocytes de lapin détermine, après injection, une thrombopénie accompagnée de multiples hémorragies.

En 1922, Bedson [7] confirmait que le seul sérum anti-thrombocytes provoque un purpura indépendant de tous phénomènes d'hémolyse ou d'agglutination. Roskam [61], de son côté, démontrait que le purpura hémorragique est dû à l'association de thrombopénie et de lésions vasculaires. Il a observé aussi que l'injection de ce sérum en différents points de l'organisme provoque des œdèmes locaux et des exsudats de type inflammatoire associés à du purpura.

Filo [21], en 1936, apportait une précision importante : chez le cobaye, l'injection de sérum thrombolytique peut déterminer des hémorragies qui ne sont pas liées à la thrombopénie.

Nous ne pouvons que constater une certaine parenté entre les résultats obtenus par ces différents auteurs à l'aide de sérums immuns-animaux et nos résultats avec des sérums d'auto-immunisation humaine.

Nous retrouvons l'action thrombopéniante importante spécifique, les hémorragies viscérales, les œdèmes locaux avec exsudats de type inflammatoire.

Cette identité de résultats nous amène à conclure que, dans les cas d'auto-immunisation anti-thrombocytaire, dont nous avons pu déterminer la nature immunologique, le facteur anti-thrombocytaire est un anticorps qui possède une double action : il est, à la fois, thrombotoxique et angiotoxique.

Cette seconde propriété permettrait ainsi d'expliquer les phénomènes hémorragiques que ne suffit pas à expliquer la seule thrombopénie.

CONCLUSIONS

L'étude des problèmes immuno-hématologiques posés par les thrombocytes nous a permis de noter les faits suivants :

I. — Les thrombocytes du sang humain peuvent posséder l'antigène A et l'antigène B.

II. — L'absence ou la présence soit isolée soit simultanée de l'antigène A et de l'antigène B dans les thrombocytes montre la concordance entre les groupes sanguins des hématies et des thrombocytes.

III. — Nous avons mis en évidence dans les thrombocytes, par une technique d'absorption sérique, l'antigène D du système groupal Rhésus.

IV. — La présence de l'antigène D sur les thrombocytes permet d'expliquer certains syndromes hémorragiques de la maladie hémolytique périnatale par immunisation anti-Rhésus.

V. — L'injection à l'animal (lapin) du sérum d'un sujet atteint de thrombopathie immunologique engendre chez celui-là une thrombopénie importante qui fait défaut chez les animaux témoins recevant la même dose de sérum normal.

Ce test peut être considéré comme spécifique.

VI. — L'étude anatomo-pathologique des lapins tués par ces sérums nous a permis de conclure à la dualité de l'anticorps antithrombocytaire, qui est à la fois thrombotoxique et angiotoxique.

SERMENT

En présence des Maîtres de cette école et de mes condisciples, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la Médecine.

Je donnerai mes soins à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail. Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira les secrets qui me seront confiés, et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime.

Reconnaissant envers mes Maîtres, je tiendrai leurs enfants et ceux de mes confrères pour des frères, et, s'ils devaient apprendre la médecine ou recourir à mes soins, je les instruirais et les soignerais sans salaire ni engagement.

Si je remplis ce serment sans l'enfreindre, qu'il me soit donné de jouir heureusement de la vie et de ma profession, honoré à jamais parmi les hommes, et, si je le viole et que je me parjure, puissé-je avoir un sort contraire.

Vu : Pour le Doyen :
L'Assesseur,
R. SIGALAS.

Vu, bon a imprimer :
Le Président,
L. MASSÉ.

Vu et permis d'imprimer :
Bordeaux le 9 juillet 1954.
Le Recteur de l'Académie,
E. DELAGE.

BIBLIOGRAPHIE

1. Abrami (P.), Bertrand-Fontaine (T.), Lichtwitz (A.) et Fouquet (P.). — De l'origine splénique du purpura. *Le Sang*, 6 avr. 1932, 6, 559-569.
2. Ackroyd (J. F.). — Mechanism of reduction of clot retraction by sedormid (ureide preparation) in blood of patients who have recovered from sedormid purpura. *Clin. Sc.*, 1949, 8, 235-267.
3. — The Pathogenesis of thrombocytopenic purpura due to hypersensitivity to sedormid. *Clin. Sc.*, 1949, 8, 269-289.
4. — The role of complement in sedormid-purpura. *Clin. Sc.*, 1951, 10, 185-205.
5. Adelson (E.), Stefanini (M.). — Studies on platelets IV. Demonstration et characterization of a heterologous (Forssman) platelet agglutination. *Blood*, 1952, 7, 700-710.
6. Avi (R.), Blanco (P.). — Purpura thrombocytopénique aigu avec hémorragie méningée au cours d'une varicelle commune; guérison par splénectomie. *Annals Fac. Med.*, Montevideo, 1951, 36, n° 1, 55-61.
7. Bedson (S. Ph.). — Blood platelet anti-serum; its specificity and role in experimental production of purpura. *Journ. Path. Bact.*, 1922, 25, 94-104.
8. Belloni (F.). — Porpora thrombopenica da sedormid. *Haem. Arch.*, 1951, 25, 125-138.
9. Bessis (M.). — Traité de cytologie sanguine. Un vol., Masson, édit., Paris, 1954.
10. Bier (O.). — Observations préliminaires sur l'hémagglutination; l'hémolyse et la conglutination passives. *Ann. Inst. Pasteur*, 1951, 81, 650-656.
11. Bigelon (F. S.), Desforges (J.-F.). — Platelet agglutination by abnormal plasma factor in quinidine ingestion. *Amer. Journ. Med. Sc.*, 1952, 224, 274-280.

12. Boyden (S. V.). — The adsorption of protein on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by antiprotein sera. *Journ. Ex. Med.*, 1951, 93, 107-120.

13. Brinkhous (J.), Emerson (L.). — Use of protective interfaces in blood collection and storage in : The preservation of the formed elements and of the proteins of the blood. *Amer. Nation. red cross*, 1949, 308.

14. Calo (A.), Diacono (G.). — Purpura hémorragique thrombocytopénique par intolérance à l'allyl-isopropul-acétyl-carbamide (Sédormid). *Le Sang*, 1954, 25, 2, p. 84-89.

15. Code (C. F.). — Histamine in blood. *Physiol. Rev.*, 1952, 32, 47-65.

16. Cruz (W. O.), Moussatche. — Haematological and blood pressure changes during shock by antiplatelet serum. *Acta Haematologica*, 1951, 1, 6, 56-61.

17. Dausset (J.), Delafontaine (P.), Feuriot (Y.). — Agglutination et destruction *in vitro* de plaquettes normales par le sérum d'une malade atteinte de purpura thrombopénique aigu. Inhibition par le sérum de la rétractation du caillot normal. *Le Sang*, 1952, 23, 373, 384.

18. Dujarric de La Rivière (R.), Eyquem (A.). — Les groupes sanguins chez les animaux. Un vol., Editions médicales Flammarion, Paris, 1953.

19. Evans (R. S.), Takahashi (K.), Duane (R. T.), Peyne (R.) et Chi-Kong-Liu. — Primary thrombocytopenic purpura and acquired haemolytic anemia. Evidence of a common etiology. *Arch. Ind. Med.*, 1951, 87, 48-65.

20. Favre-Gilly (J.) et Dameshek (W.). — Un nouveau cas de thrombocytopathie hémorragique. Succès d'une transfusion de sang siliconé et riche en plaquettes. Etude de la survie des plaquettes. *Lyon médical*, 1950, 183, 14, 223-227.

21. Filo (E.). — Anémies et thrombopénies trombolytiques expérimentales. *Le Sang*, 1936, 10, 704-726.

22. Fisher, Krazenski. — Purpura thrombocytopénique après rubéole. *Arch. of Dis. Child.*, 1951, 27-132, 144-146.

23. Flemming (S.), Kissmeyer-Nielsen (F.). — Idiopathic thrombocytopénic purpura. *Acta Med. Scand.*, 1951, 141, 111.

24. Fluckiger (P.), Hassig (A.), Koller (F.). — Ueber den thrombocyten Coombs test. in Sch. *Wochrs.*, 1093, 83, 43, 1035.

25. Fonio (A.), Schwedener (J.). — Die Thrombozyten des Menschlichen Blutes. Un vol. Hans-Huber, édit., Bern.

26. Freeman (G.). — Method for obtaining large yields of human platelets as a by product of blood collection. *Science*, 1951, 114, 527-528.

27. Grabar (P.). — Hemagglutination passive (technique et conséquences physiopathologiques). *Journ. de méd. Bordeaux*, 1953, n° 2, 323-330.

28. Graziadei (P.). — Sulla persistenza delle piastrine del sangue conservato. *Monitore. Zool. Ital.*, 1951, 60, Supp., 191, 192.

29. Harrington (W. J.), Minnich (V.), Hollingsworth (J. W.), Moore (C. V.). — Demonstration of a thrombocytopenic factor in the blood of patients with thrombocytopenic purpura. *Journ. Lab. Clin. Med.*, 1951, 38, 1, 10.

30. Harrington (W. J.), Spraguel (H. C.), Minnich (V.), Moore (C. V.), Aulvin (R. C.), Dubach (R.). — Immunologic mechanism in idiopathic and thrombocytopenic purpura. *Ann. of Int. Med.*, 1953, 38, 433.

31. Hirsch (E. O.), Gardner (F. H.). — Life span of transfused human blood platelet. *Journ. Clin. Invest.*, 1951, 30. 649, 28-35.

32. Hirsch (E. O.), Favre Gilly (J.), Dameshek (W.). — Thrombopathic thrombocytopenia : successful transfusion of blood platelets. *Blood*, 1950, 5, 568-580.

33. Hirsch (E. O.), Gardner (F. H.). — The transfusion of human blood platelets. *Journ. Lab. and Clin. Med.*, 1952, 39, 556-569.

34. Hirsch (E. O.), Gardner (F. H.). — Isolation and concentration of human blood platelets. *Journ. Clin. Invest.*, 1952, 31-638.

35. Instone (E.). — Thrombocytopenic purpura due to sensitivity to Sedormid. *Lancet*, 5 juin 1948, 254, 869.

36. Jaques (L. B.), Fidlar (E.), Felsted (R.), Mac Donald (D.). — Silicones and blood coagulation. *Canad. Med. Amer. Journ.*, 1946, 55, 26-31.

37. Jamra (M.), de Angelis (C.), Verrastro (T.), Coelho (E.). — Sur l'existence de l'activité thrombocytolytique dans le plasma d'un cas de purpura thrombocytopénique. *Le Sang*, 1953, 24, 699-712.

38. Kallos (P.), Deffner (L. K.). — Agglutination spécifique sérique de corpuscules (pellets de collodion ou érythrocytes (recouverts de matériel allergique. *Inter. Arch. Allerg. App. Immunol.*, 1951, 2, 70-75.

39. Keogh (V.), North (E. A.), Warburton (M.). — Absorption of bacterial polysaccharide to erythrocytes. *Nature*, 1948, 161, 4097, 687-688.

40. Kerhulas (A. H.), Ohler (R. L.). — Waren (R.), Belko (J. S.). — Activity of megakaryocytes in the post operative state. *Blood*. 1951, 6, 945-948.

41. Kissmeyer-Nielsen (F.). — Demonstration of platelet antibodies by haemagglutination of antigen coated tanned erythrocytes. *Vox Sanguinis*, 1953, 3, 6, 123-129.

42. Ledingham (J. C. G.), Aberd (M. B.). — The experimental production of purpura in animals by the introduction of antiblood plate sera. *Lancet*, 1914, 186, 1673.

43. Maupin (B.). — Séparation et transfusion des éléments figurés du sang. *C. R. IV^e Congr. int. Trans. sang.*, Lisbonne, 1951, 132-143.

44. Maupin (B.), Chary (R.). — Présentation d'une nouvelle méthode de séparation des leucocytes et des plaquettes sanguines. *Le Sang*, 1952, 4, 336-340.

45. Maupin (B.). — Acquisitions récentes sur l'histochimie et la biochimie des plaquettes sanguines chez l'homme. *Rev. hématol.*, 1953, 8, 3, 302-315.

46. — Recherches histochimiques et biochimiques sur les plaquettes sanguines de l'homme. Thèse de doctorat ès sc., Paris, 1953.

47. Margulis (H.), Barker (N. W.). — The coagulation time of blood in silicone tubes. *Amer. Journ. Med. Sc.*, 1949, 218, 42.

48. Marino (M.-F.). — Recherches sur les plaquettes du sang. *C. R. Soc. biol.*, 1905, 58-194.

49. Miescher (P.). — Nouvelles acquisitions concernant la pathologie de la thrombopénie essentielle. *Helvet. Med. Acta*, 1952, 19, 434-441.

50. Minor (A. H.), Burnett (L.). — A method for separating and concentrating platelets from normal human blood. *Blood*, 1952, 7, 693-699.

51. Moulinier (J.). — Recherches immunologiques dans les leucoses. Communication IV[e] Congrès Soc. Europ. Hém., Amsterdam sept. 1953.

51. — Un test de sécurité pour la détermination du type Rh négatif (D-négatif). *Ann. Biol. Clin.*, 1954, 1-2, p. 21-25.

53. Moureau (P.), André (A.). — Présence des antigènes A et B dans les plaquettes. *Vox Sanguinis*, 1954, 4, 46-51.

54. Muniz (J.). — Sur la valeur de l'hémolyse conditionnée dans le diagnostic de la trypanosomiase américaine. *O. Hospital*, 1950, 199-205.

55. Muniz (J.), Santos (M.). — Technique de l'hémolyse conditionnée appliquée au diagnostic de la trypanosomiase américaine. *O. Hospital*, 1950, 617-620.

56. Neel (R.), Taslimi (H.). — Les hématies tannées et sensibilisées employées dans la réaction d'hémagglutination protéinique de la peste ne sont plus sensibles à l'hémolyse, l'agglutination et la conglutination naturelles. *Annales de biol. clin.*, 1954, 1-2, 98-100.

57. Ninni (M.). — Dimonstrazione di un attivita piastrinolitica presente *in vitro* nel siero di sangue degli ammalati di porpora piastrinopenica essenziale. *Haemat. Arch.*, 1952, 36, 693-699.

58. Ollgard (E.). — La rétraction du caillot : test quantitatif du fonctionnement et de l'agglutinabilité des plaquettes. *Acta Haematol.*, 1951, 6, 4, 220-230.

59. Randak (K.), Danforth (M.). — Purpura thrombocytopénique pendant la grossesse. *Quart. Bull. North Univ. Med. School*, 1951, 25, 3, 199-202.

60. Roskam (J.). — Mouillabilité des surfaces de verre ayant été au contact de plasma opsonisant ou non opsonisant. *C. R. Soc. biol.*, 1939, 3.

61. — Purpuras hémorragiques. Pathogénie du syndrome hémogénique engendré par l'administration de sérum antiplaquettes. *Le Sang*, 1934, 8, 129-131.

62. Sacerdotti (C.). — Les plaquettes des mammifères et le sérum antiplaquettique. I. Etat actuel des connaissances sur les plaquettes des mammifères. II. Le sérum antiplaquettique. *Arch. Ital. Biol.*, 1909, 52, 153-170.

63. Soulier (J.-P.). — Etude génétique des syndromes hémorragiques. *Le Sang*, 1954, 25-4, 355-383.

64. Stefanini (M.), Chatterjea, Dameshek (W.). — Rate of platelet survival in thrombocytopenia. *Journ. Clin. Invest.*, 1951, 30, 676.

65. Stefanini (M.), Dameshek (W.). — Shortened survival time and developpment of platelet agglutinins following multiple platelet transfusions. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1952, 80, 230-235.

66. Stefanini (M.), Chatterjea (W.), Addelson (E.). — Immunologic aspects of idiopathic thrombocytopenic purpura. *Journ. clin. Invest.*, 1952, 31, 665.

67. Stefanini (M.), Chatterjea (W.). — Thrombocytopenic factor in normal human blood plasma or serum. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 1952, 79, 623-629.

68. Stefanini (M.), Chatterjea (W.), Dameshek (W.), Zannos (S.), Santiago. — The effect of transfusion of platelet rich polycythemic blood on the platelets and hemostatic function in idiopathic and secundary thrombocytopenic purpura. *Blood*, 1952, 7, 53-76.

69. Stefanini (M.), Dameshek (W.). — Collection, preservation and transfusions of platelets. *New England Journ. Med.*, 1953.

70. Tatlow (W. F. T.). — Acute purpura with neurological complications associated with sedormid therapy. *Brit. Med. Journ.*, 1948, 18 sept., 558.

71. Travis (B. L.), Ferguson (J. H.). — Proteolytic enzymes and platelets in relation to blood collection. *North Carolina Journ. Clin. Invest.*, 1951, 30, 112-123.

72. Tullis (J.). — Bloods cells and plasma proteins; their state in nature (Memoirs of the University Laboratory of Physical Chemistry related to Medicine and Public Health, Harvard University, Ill., *Acad. Press. Inc.*, New-York, 436 p., 1953.

73. — The separation and preservation of human platelets *C. R. IV^e Congr. Int. Trans. Sang.*, Lisbonne, 1951, 145-146.

74. — Conservation des plaquettes. *Amer. Journ. Med. Sc.*, août 1953, **226**, n° 976, 191-202, 5 fig., 3 tabl. (Bibliogr.).

75. Tullis (J.), Rochow (E. G.). — Non wettable surfaces. *Blood*, 1952, 7, 850-854.

76. Tzanck (A.), Dreyfuss (A.). — Le comportement des plaquettes et des leucocytes dans le sang conservé. *Le Sang*, 1937, 11, 606-610.

77. Tzanck (A.), Soulier (J.-P.). — Les syndromes hémorragiques. Baillière, édit., Paris, 1949.

78. Valette (G.), Maupin (B.), Huidobro (H.). — Plaquettes sanguines et histaminase. *C. R. Soc. biol.*, 1951, 145, 313-315.

79. Van Creveld (S.), Paulssen (M.), Bartels (H.). — Transfusions of suspensions of blood platelets in thrombocytopenia and thrombopathia. *Journ. Clin. Path.*, 1953, 6, 41-45.

80. Waldenstrom (J.) .— Trois nouveaux cas de purpura hyperglobulinémique. *Acta Med. Scand.*

81. Warren (R.), Lauridsen (J.), Belko (J.). — Alterations of numbers of circulating platelets following surgical operations and administration of A. C. T. H. *Circulation*, 1953, 7, 481-486.

Dépôt légal effectué en 1954 (3e trimestre).

26974. — Imprimeries DELMAS, Bordeaux (31.0792). — 1954.